

**Charakterisierung der Funktion des
Transkriptionsfaktors Gfi1 während der T-Zell
vermittelten Immunantwort in Gfi1-defizienten Mäusen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Denise Pargmann

aus Essen
Juni 2005

Die der nachfolgenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Tarik Möröy

2. Gutachter: Prof. Dr. Helmut Esche

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. R. Hensel

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Dezember 2005

Für Arnd

Gott würfelt nicht

INHALT

1	Einleitung	1
1.1	Die Immunabwehr gegen Infektionen.....	1
1.2	Die T-Zell vermittelte Immunantwort	2
1.2.1	Die Entwicklung der T-Lymphocyten.....	2
1.2.2	Die Aktivierung der T-Lymphocyten über den TCR Komplex.....	4
1.2.3	Die Differenzierung von naiven T-Lymphocyten zu T-Effektorzellen	7
1.2.4	Die Funktion von $\gamma\delta$ T-Zellen.....	11
1.2.5	Die Entstehung des immunologischen Gedächtnis	12
1.2.6	Der Mechanismus des programmierten Zelltods.....	16
1.3	Das Friend Virus Modell.....	19
1.4	Der pal-1 Lokus.....	21
1.5	Zielsetzung der Arbeit	27
2	Ergebnisse.....	28
2.1	Herstellung Evi5-defizienter „Knock Out“ Mäuse	28
2.1.1	Auswirkungen der Evi5-Defizienz in hämatopoetischen Zellen	30
2.2	Periphere T-Zellpopulationen in Gfi1-defizienten Mäusen	32
2.2.1	Verteilung der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	32
2.2.2	$\gamma\delta$ T-Zellen in Gfi1-defizienten Mäusen	34
2.2.3	Gedächtnis T-Zellen in Gfi1-defizienten Mäusen	35
2.2.4	Apoptose in Gedächtnis T-Zellen.....	38
2.2.5	Doppelkreuzung der Gfi1-defizienten Mäuse mit „vav-Gfi1“ transgenen Mäusen	39
2.2.6	IL-7 Rezeptor Expression auf naiven und Gedächtnis T-Zellen	40
2.3	Das Proliferationsverhalten von Gfi1-defizienten T-Zellen	41
2.3.1	Aktivierung von T-Zellen und die Progression im Zellzyklus	41
2.3.2	Proliferationsverhalten der Gfi1 ^{-/-} T-Zellen.....	44
2.4	Die Rolle des programmierten Zelltods in Gfi1 ^{-/-} T-Zellen	48
2.4.1	Aktivierungs-induzierter Zelltod (AICD) in peripheren T-Zellen.....	48
2.5	Analyse putativer Zielgene von Gfi1 mit Hilfe des DNA-Arrays.....	51
2.5.1	Biologische Prozesse in wt und Gfi1 ^{-/-} T-Zellen nach TCR-Stimulation	51
2.5.2	Gene der positiven Regulation der Apoptose.....	53
2.5.3	Gene der Lymphocyten Aktivierung und der Apoptose.....	54
2.6	Genexpressionen der unterschiedlich regulierten Gene	57

2.7	Real-Time PCR der unterschiedlich regulierten Gene in Gfi1-defizienten und wt T-Zellen, während der Antigenstimulation	58
2.8	Friend Virusinfektion von Gfi1-defizienten Mäusen	60
2.8.1	Infektionsverlauf der Friend Virusinfektion.....	60
2.8.2	B und T-Zellen in Friend Virus infizierten Mäusen	63
2.8.3	Die Bildung von Gedächtnis T-Zellen nach Friend Virusinfektion	66
2.8.4	Die Zytokinproduktion Friend Virus infizierter T-Zellen	67
2.8.5	$\gamma\delta$ T-Zellen in Friend Virus infizierten Mäusen.....	70
3	Diskussion.....	71
3.1	Gfi1 beeinflusst die Zusammensetzung der peripheren T-Zellpopulationen	71
3.2	Gfi1 spielt eine Rolle bei der Bildung des immunologischen Gedächtnisses	74
3.3	Gfi1 steuert die T-Zellantwort	77
3.4	Die Rolle von Gfi1 während des aktivierungs-induzierten Zelltods.....	78
3.5	Gfi1 ist in die biologischen Prozesse der Zellaktivierung und des Zelltods involviert.	80
3.6	Die Rolle von Gfi1 im Verlauf einer Friend Virusinfektion.....	86
3.6.1	Gfi1-defiziente C57Bl/6 Mäuse sind nicht resistent gegenüber einer Friend Virusinfektion.....	86
3.6.2	Gfi1-defiziente CD8 ⁺ T-Zellen besitzen eine nicht eingeschränkte Effektorfunktion.....	87
3.6.3	Die Bildung von Gedächtnis T-Zellen in Friend Virus infizierten Gfi1-defizienten Mäusen	89
4	Zusammenfassung	91
5	Material und Methoden	93
5.1	Statistische Auswertungen	93
5.2	Chemikalien, Enzyme, Lösungen	93
5.2.1	Häufig verwendete Lösungen.....	93
5.2.2	Verwendete Größenmarker	95
5.2.3	Verwendete Antikörper	95
5.3	Organismen	97
5.3.1	Verwendeter Bakterienstamm	97
5.3.2	Verwendeter Maustamm	97
5.4	Molekularbiologische Methoden	97
5.4.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	97
5.4.2	Transformation Hitze-Schock kompetenter Bakterien	98
5.4.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	98
5.4.4	Plasmid-DNA Aufreinigung im kleinen Maßstab zur Analyse.....	98
	(Mini-Präp) (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979)	98

5.4.5	Plasmid-DNA Aufreinigung im großen Maßstab (Maxi-Präp)	99
5.4.6	Isolierung von genomischer DNA	99
5.4.7	Restriktionsendonuklease Verdau von DNA	100
5.4.8	Agarose-Gelelektrophorese von DNA Fragmenten	100
5.4.9	Konversion überhängender DNA-Enden	100
5.4.10	Dephosphorylierung von 5'-Enden der DNA	100
5.4.11	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	101
5.4.12	Ligation	101
5.4.13	Polymerasekettenreaktion (PCR) (modifiziert nach Saiki <i>et al.</i> , 1985)	101
5.4.14	Real-Time PCR	102
5.4.15	Herstellung radioaktiv markierter Sonden	102
5.4.16	Transfer von DNA (Southern Blot)	102
5.4.17	Hybridisierung von DNA auf Nylonmembranen	102
5.4.18	Isolierung von RNA	103
5.4.19	Reverse Transkription	103
5.5	Protein-Techniken	104
5.5.1	Herstellung von Gesamtzellproteinextrakten	104
5.5.2	Auftrennung von Proteinen (SDS-Page) (Laemmli, 1970)	104
5.5.3	Protein-Transfer (Semi-dry Western-Blot) (modifiziert nach Khyse-Anderson, 1984)	105
5.5.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen	106
5.6	Zellkultur-Techniken	106
5.6.1	Medien/Lösungen und mitogene Substanzen	106
5.6.2	ES-Zellkultur	107
5.6.3	Transfektion und Selektion von ES-Zellen	107
5.6.4	Herstellung embryonaler Mausfibroblasten (MEFs)	108
5.6.5	Passagieren von Zellen	108
5.6.6	Einfrieren und Auftauen von Zellen	108
5.6.7	Isolation von T-Zellen aus Organen	109
5.6.8	Erythrocytenlyse	109
5.6.9	Aufreinigung von Zellen durch MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)	109
5.6.10	Kultivierung von murinen Lymphocyten	110
5.7	Durchflusszytometrie (FACS, Fluoreszenz Activated Cell Sorting)	110
5.7.1	Darstellung von Oberflächenmarkern	110
5.7.2	Intrazelluläre Zytokinfärbung	111
5.7.3	Detektion apoptotischer Zellen über AnnexinV Färbung	112
5.7.4	Untersuchung des Zellzyklus durch Propidium Iodid Färbung	112
5.7.5	Untersuchung der T-Zellproliferation durch CFSE Färbung	113
6	Literaturverzeichnis	114

7	Anhang	124
7.1	Abkürzungsverzeichnis	124
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	127
7.3	Verwendete Primer und Real-Time PCR Assays.....	129
7.3.1	Primer	129
7.3.2	Real-Time PCR Assays (Applied Biosystems)	130
7.4	Lebenslauf.....	131
7.5	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	132
7.5.1	Fachartikel.....	132
7.5.2	Poster.....	132
7.5.3	Vortrag	132
7.6	Danksagung	133
7.7	Ehrenwörtliche Erklärung.....	135

1 Einleitung

1.1 Die Immunabwehr gegen Infektionen

Es gibt zwei grundlegende Mechanismen, durch die das Immunsystem Krankheitserreger bekämpfen kann. Kommt es zu einer Infektion durch Pathogene, werden diese meistens innerhalb kürzester Zeit aufgespürt und beseitigt. Diese angeborene Immunität ist nicht Antigen spezifisch, sehr schnell und innerhalb von Stunden induzierbar (Medzhitov und Janeway, 1997). Sie wird zum größten Teil von Granulocyten getragen, die auch als polymorphkernige Leukocyten bezeichnet werden. Diese Gruppe von Zellen, zu denen die basophilen, eosinophilen und neutrophilen Zellen gehören, stammen alle von einer myeloiden Vorläuferzelle aus dem Knochenmark ab (Orkin, 1995). Die wichtigsten phagocytierenden Zellen, die die angeborene Immunität vermitteln, sind neutrophile Granulocyten und Monocyten, die Vorläuferzellen der Makrophagen. Beide Zelltypen besitzen Oberflächenrezeptoren, die bakterielle und virale Pathogene erkennen können.

Kann die Infektion nicht effektiv beseitigt werden und durchbrechen die Erreger die erste Barriere der angeborenen Immunität, kommt es zum Einsatz der erworbenen, adaptiven Immunantwort. Im Gegensatz zur angeborenen Immunität ist diese adaptive Immunantwort Antigen spezifisch. Nach einer gewissen Anlaufphase bilden sich spezialisierte Effektor Zellen, die hocheffizient arbeiten und durch verschiedene Mechanismen Pathogene eliminieren (Le Bon und Tough, 2002). Für die erfolgreiche Bekämpfung einer Infektion ist von entscheidender Bedeutung, dass eine enge Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität besteht. Der Zelltyp, der hierbei eine Schlüsselrolle spielt, sind die dendritischen Zellen (DC). Sie gehören zu den professionellen, Antigen präsentierenden Zellen (APC), die in der Lage sind, Peptidfragmente von Krankheitserregern an bestimmte Moleküle, den MHC Komplexen (Major Histokompatibility Complex), auf ihrer Oberfläche zu binden. Die Peptide werden den naiven T-Zellen präsentiert, was zu deren Aktivierung führt (Banchereau *et al.*, 2000). Neben Makrophagen und dendritischen Zellen gehören auch die B-Lymphocyten zu den APCs, deren Oberflächenimmunglobuline als Antigenrezeptoren dienen. Durch die Bindung eines Antigens an den B-Zellrezeptor wird ein Signal in das Innere der Zelle geleitet, das sie zur Proliferation und Differenzierung in eine Antikörper produzierende Plasmazelle anregt. Diese Aktivierung wird durch spezifische T-Helferzellen verstärkt, denen von der B-Zelle MHC II gebundene Antigene präsentiert werden. Die von

den Plasmazellen gebildeten Antikörper bilden die humorale Immunantwort, wobei es drei unterschiedliche Wirkungsmechanismen gibt, mit denen die freigesetzten Antikörper eine Infektion bekämpfen können. Zum einen können sie Pathogene neutralisieren. Dazu binden sie die Erreger und verhindern so, dass diese an die Wirtszelle andocken und eindringen können. Zum anderen unterstützen sie den Prozess der Opsonierung, indem sie dazu beitragen, dass Keime, die mit Antikörpern bedeckt sind, besser von phagocytierenden Zellen aufgenommen werden. Zuletzt können Antikörper die Proteine des Komplementsystems aktivieren, was unter anderem zu einer direkten Lyse der Antikörper gebundenen Mikroorganismen führt (Übersicht: Janeway, 2. Auflage, 1997).

1.2 Die T-Zell vermittelte Immunantwort

1.2.1 Die Entwicklung der T-Lymphocyten

Die T-Zellen entwickeln sich aus Knochenmarkstammzellen, die zu allgemeinen lymphoiden Vorläuferzellen (CLP) differenzieren. Diese Zellen verlassen das Knochenmark und wandern in den Thymus ein. Hier beginnt die T-Zellentwicklung, bei der sich die unreifen Thymocyten zu reifen, funktionsfähigen T-Zellen entwickeln. Die vollständig differenzierten T-Zellen verlassen den Thymus und werden über die Blutbahn in die peripheren lymphatischen Gewebe transportiert.

Der Reifungsprozess der T-Zellen umfasst mehrere Stadien, die alle von verschiedenen Differenzierungs- und Proliferationsschritten abhängen. Die einzelnen Entwicklungsstufen der Thymocyten lassen sich anhand phänotypischer Veränderungen der Zelloberfläche charakterisieren. In jedem Stadium findet man ein typisches Expressionsmuster bestimmter Proteine auf der Oberfläche der Zellen (Kisielow und von Boehmer, 1995; von Boehmer und Fehling, 1997). Die frühen Thymocyten exprimieren noch keines der Moleküle, die reife T-Zellen definieren, wie zum Beispiel den CD3 T-Zellrezeptor Komplex (TCR) oder die Korezeptoren CD4 und CD8. Sie werden daher als CD4⁻CD8⁻ doppelt negative (DN) T-Zellen bezeichnet (Sebzda *et al.*, 1999). Die DN Thymocyten stellen eine heterogene Zellpopulation dar, die sich in vier verschiedene Entwicklungsstadien einteilen lässt.

Die früheste Population der doppelt negativen Thymocyten gehören zum DN1 Stadium. Diese Zellen exprimieren das Adhäsionsmolekül CD44 und besitzen keine IL-2 Rezeptor α -Kette

(CD25) (Pearse *et al.*, 1989; Godfrey *et al.*, 1993; Godfrey und Zlotnik, 1993; Ceredig und Rolink, 2002). Im nächsten Reifungsschritt beginnen sie, CD25 auf ihrer Oberfläche zu exprimieren und differenzieren zu DN2 Thymocyten. Anschließend geht die Expression des CD44 Moleküls zurück. In den $CD44^{lo}CD25^{+}$ T-Zellen der DN3 Population beginnt die Umlagerung der β -Kette des T-Zellrezeptors (Godfrey *et al.*, 1994; Petrie *et al.*, 1995). Diesen Umordnungsprozess bezeichnet man als V(D)J Rekombination (Lewis, 1994; Willerford *et al.*, 1996). War die Umlagerung der β -Kette erfolgreich, regeln die Zellen die CD25 Expression herab und treten in das DN4 Stadium ein. Diese $CD44^{-}CD25^{-}$ Thymocyten bezeichnet man als selektioniert, da sie ihre TCR β -Gene produktiv umgeordnet haben und somit einen funktionsfähigen prä-TCR Komplex aufweisen (Anderson und Perlmutter, 1995; Penit *et al.*, 1995; Zuniga-Pflücker und Lenardo, 1996). Zusammen mit dem CD3 Komplex und einer vorläufigen prä TCR α -Kette ($pt\alpha$), gelangt die β -Kette an die Zelloberfläche und bildet so den prä T-Zellrezeptor Komplex (Mombaerts *et al.*, 1992; Saint-Ruf *et al.*, 1994; Fehling *et al.*, 1995). Die doppelt negativen DN4 T-Zellen beginnen nun die die Korezeptoren CD4 und CD8 auf ihrer Oberfläche zu exprimieren und entwickeln sich zu doppelt positiven T-Zellen.

Die doppelt positiven Thymocyten reifen weiter zu einfach positiven (SP) $CD4^{+}$ oder $CD8^{+}$ T-Zellen heran. Dazu muss gewährleistet sein, dass die reifen SP Thymocyten sowohl Fremdantigene, als auch körpereigene MHC Moleküle erkennen, bevor sie den Thymus verlassen und in die Peripherie abgegeben werden. Die Thymocyten durchlaufen daher einen Prozess, den man als positive und negative Selektion bezeichnet (Nossal, 1994; von Boehmer, 1994). T-Zellen, die in der Lage sind, körpereigene MHC Moleküle zu erkennen und zusätzlich Eigenpeptid, gebundenen an Eigen-MHC mit einer geringen bis mittleren Affinität binden, bezeichnet man als positiv selektioniert. Thymocyten, die einen TCR tragen, der mit einer hohen Affinität Eigenpeptid, gebunden an körpereigenes MHC, erkennt oder denen eine TCR-MHC-Peptid Interaktion fehlt, werden durch programmierten Zelltod eliminiert (Sebzda *et al.*, 1999). Diesen Prozess bezeichnet man als negative Selektion, wodurch sicher gestellt wird, dass keine autoreaktiven T-Zellen den Thymus verlassen können (von Boehmer, 1992; Owen und Venkitaraman, 1996). Nur 5% der doppelt positiven Thymocyten überstehen die positive und negative Selektion und reifen entweder zu $CD4^{+}$ oder zu $CD8^{+}$ SP Thymocyten heran. Die restlichen 95% werden durch Apoptose eliminiert. Die reifen T-Zellen werden in die Blutbahn abgegeben und gelangen von dort in die Lymphbahn zu den peripheren lymphatischen Geweben.

1.2.2 Die Aktivierung der T-Lymphocyten über den TCR Komplex

Nachdem die reifen T-Zellen den Thymus verlassen haben, zirkulieren sie durch die Blutbahn und die peripheren lymphatischen Organe, bis sie auf ein Antigen treffen. Diese naiven T-Zellen sind jedoch allein nicht in der Lage, Krankheitserreger zu bekämpfen. Erst durch die Antigenbindung werden sie zur Proliferation und Differenzierung angeregt und werden zu bewaffneten T-Effektorzellen. Die Antigenerkennung durch den T-Zellrezeptor ist das Schlüsselereignis für das Auslösen der adaptiven Immunantwort. Der physiologische Ligand für die T-Zellaktivierung stellt das Fremdantigen, gebunden an den MHC Komplex von professionellen, Antigen präsentierenden Zellen dar. Der T-Zellrezeptor besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, den sogenannten TCR α - und TCR β -Ketten. Beide Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden, so dass der extrazelluläre Anteil des Rezeptors, dem der Fab-Fragmente der Immunglobuline ähnelt. Das $\alpha\beta$ Heterodimer, zusammen mit einem der beiden CD4 oder CD8 Korezeptoren, interagiert mit der Antigen MHC Einheit. Die Ketten des T-Zellrezeptor Heterodimers besitzen eine kurze zytoplasmatische Domäne, die nicht in der Lage ist, das Signal in das Zellinnere weiterzuleiten. Hierfür ist der sogenannte CD3 Komplex zuständig. Er besteht aus drei verschiedenen Proteinen, die zu zwei Heterodimeren, $\epsilon\delta$ und $\gamma\epsilon$, assoziiert sind. Zusätzlich ist eine weitere Untereinheit, die ζ -Kette mit dem TCR Komplex verbunden und leitet die Übertragung der Signale in das Innere der Zelle. Die zytoplasmatischen Domänen der CD3 Moleküle verfügen über ein gemeinsames Sequenzmotiv, die ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine based Activation Sequence Motifs) (Qian und Weiss, 1997). Nach der Stimulation des Rezeptors werden diese ITAMs durch bestimmte Protein-Tyrosinkinasen (Lck und Fyn) phosphoryliert. Lck ist mit der zytoplasmatischen Domäne der CD4 und CD8 Korezeptoren verbunden, wobei Fyn sich im Zytoplasma befindet und sich bei TCR-Aktivierung an die CD3 ζ - und CD3 ϵ -Kette anlagert. Durch die Phosphorylierung kann eine Protein-Tyrosinkinase (PTK) das ζ -assoziierte Protein ZAP-70 an den TCR Komplex binden (Chan *et al.*, 1995; Hatada *et al.*, 1995). Fyn und Lck phosphorylieren ZAP-70 und führen so zur Aktivierung des Proteins. Nachdem ZAP-70 aktiviert worden ist, löst es eine Kette von Signalwegen aus. Eine Schlüsselrolle spielt dabei die Aktivierung der GTPasen Ras und Rho. Der Aktivierungsstatus von Ras ist, wie bei allen GTPasen, durch zwei Gruppen von regulatorischen Proteinen kontrolliert. Zum einen von den GEFs (Nucleotide Exchange Factors), die den Übergang der inaktiven GDP gebundenen Form in die aktive GTP gebundene Form fördern und zum anderen von den GAPs (GTPase Activating Proteins), die die GTPase Inaktivierung unterstützen. Ein wichtiger Nukleotid Austauschfaktor für Ras ist

das sogenannte Sos Protein. Sos ist konstitutiv mit einem weiteren Protein, Grb2 assoziiert, wobei dessen SH2 Domäne mit Tyrosin phosphorylierten Rezeptoren oder Adapter Proteinen interagiert, um so die Membranlokalisation und katalytische Aktivität von Sos zu regulieren (Smit *et al.*, 1994; Katz und McCormick, 1997). Das aktive Ras aktiviert weitere Proteinkinasen, wie Raf-1, MEK und ERK, was letzten Endes zur Aktivierung von AP-1 Transkriptionsfaktoren führt (Cheng und Chan, 1997). AP-1 ist sowohl allein, als auch in Assoziation mit NFAT (Nuclear Factor of Activated T-Cells), einem T-Zell spezifischen Protein, in der Lage die Transkription vieler Zielgene zu induzieren. Parallel zum Ras/Raf-1/MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) Weg, findet die Aktivierung der Rac/Rho Kaskade über Vav1 statt. Vav1 ist ein selektiver GEF für Rac, welcher zur Rho Familie gehört (Crespo *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1997). Es spielt nicht nur eine essentielle Rolle bei der positiven Selektion der Thymocyten, sondern auch bei der Kontrolle mehrerer Zytokingene in peripheren Lymphocyten (Fischer *et al.*, 1995; Tarakhovsky *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 1997).

Als Antwort auf die Antigenstimulation formt Vav1 einen Komplex mit SLP-76 (Tuosto *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996). Durch die Phosphorylierung von SLP-76 wird der jun-Kinase Weg aktiviert, der auch zum Transkriptionsfaktor-Komplex AP-1 führt (Katzav *et al.*, 1994; Crespo *et al.*, 1996). Eine weitere Signalkaskade wird über die Aktivierung der Phospholipase C gestartet, die Phosphatidylinositol in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) spaltet. IP₃ bewirkt die Freisetzung von Ca²⁺ Ionen aus intrazellulären Speichern, was dazu führt, dass die Phosphatase Calcineurin die NFAT Transkriptionsfaktoren dephosphoryliert (Rudd, 1996). Dadurch können diese in den Zellkern gelangen und dort die Transkription mehrerer Zielgene, wie zum Beispiel das des Wachstumsfaktors IL-2, induzieren (Serfling *et al.*, 1995). Diacylglycerin (DAG) bewirkt dagegen die Aktivierung der Proteinkinase C, wodurch die Translokation des Transkriptionsfaktors NFκB in den Zellkern erfolgt (Gilmore *et al.*, 1996). Zusammen mit NFAT und AP-1 veranlaßt NFκB die Expression weiterer Zielgene, was schließlich zur Proliferation und Differenzierung der T-Zellen zu Effektorzellen führt.

Signalkaskade, die durch die Stimulation des T-Zellrezeptor Komplex durch die Präsentation eines passenden Antigens ausgelöst wird.

6

APCs befinden, wird CD28 an seiner zytoplasmatischen Domäne phosphoryliert. Dies führt zur Aktivierung von Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) (Jenkins, 1994; Schneider *et al.*, 1995), Grb2 (Schneider *et al.*, 1995) und ITK, einer T-Zell spezifischen Protein-Tyrosinkinase (August *et al.*, 1994), woraufhin die Aktivierung von c-jun initiiert wird. Dies führt zum einen zur Produktion des T-Zell Wachstumsfaktors IL-2 (Derijard *et al.*, 1994; Leach *et al.*, 1996) und zum anderen wird die Apoptose über die Regulation der Expression von Bcl-x₂ inhibiert (Boise *et al.*, 1995). In aktivierten T-Zellen wird ein weiterer Rezeptor für B7 exprimiert, der eine weit höhere Affinität zu B7 besitzt als CD28. Hierbei handelt es sich um das sogenannte CTLA-4 (CD152) Molekül (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen) (McAdam *et al.*, 1998). Die Interaktion von CTLA-4 mit B7 liefert ein inhibitorisches Signal für die T-Zellproliferation, was anhand von Antikörper vermittelter Quervernetzung von CTLA-4 auf ruhenden T-Zellen gezeigt werden konnte. Die Folge ist eine reduzierte IL-2 Produktion und das Stoppen des Zellzyklus 16 Stunden nach CTLA-4 Aktivierung (Krummel und Allison, 1996; Walunas *et al.*, 1996; Scheipers und Reiser, 1998). Der Signalweg, über den CTLA-4 seine inhibitorische Funktion entfaltet, führt über dessen Phosphorylierung. Das nicht phosphorylierte CTLA-4 ist assoziiert mit AP-2 (clathrin associated adaptor complex). Die Phosphorylierung führt zur Freisetzung von AP-2, welches eine erhöhte Zelloberflächenexpression des Proteins induziert (Thompson und Allison, 1997; Chuang *et al.*, 1999). Das CTLA-4 interagiert mit p85, einer Untereinheit der PI3K und formt einen Komplex mit der Tyrosin-Phosphatase SHP2 (Schneider *et al.*, 1995; Marengere *et al.*, 1996; Zhang und Allison, 1997; Cilio *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998). Dieser CTLA-4/SHP2 Komplex reguliert negativ die TCR-Aktivierung und inhibiert den Ras/Raf-1/MAPK Weg (Marengere *et al.*, 1996). Auf diese Weise limitiert CTLA-4 die T-Zelleffektor Antwort.

1.2.3 Die Differenzierung von naiven T-Lymphocyten zu T-Effektorzellen

In der ersten Phase der Immunantwort beginnen die T-Lymphocyten, als Reaktion auf die Antigenstimulation, zu proliferieren. Diese klonale Expansion wird vom Wachstumsfaktor IL-2 induziert. In der späten Proliferationsphase differenzieren die naiven T-Lymphocyten zu bewaffneten T-Effektorzellen. Die CD8⁺ T-Zellen entwickeln sich zu cytotoxischen (CTL) T-Lymphocyten und die CD4⁺ T-Zellen differenzieren zu T-Helferzellen (Th). Nur die aktivierten Effektorzellen sind in der Lage, infizierte Zielzellen zu töten oder weitere Zellen zu aktivieren, die die Immunreaktion aufrecht erhalten. Ein wichtiger Unterschied zwischen

naiven T-Lymphocyten und den T-Effektorzellen ist, dass eine Effektorzelle kein kostimulatorisches Signal benötigt, um aktiviert zu werden.

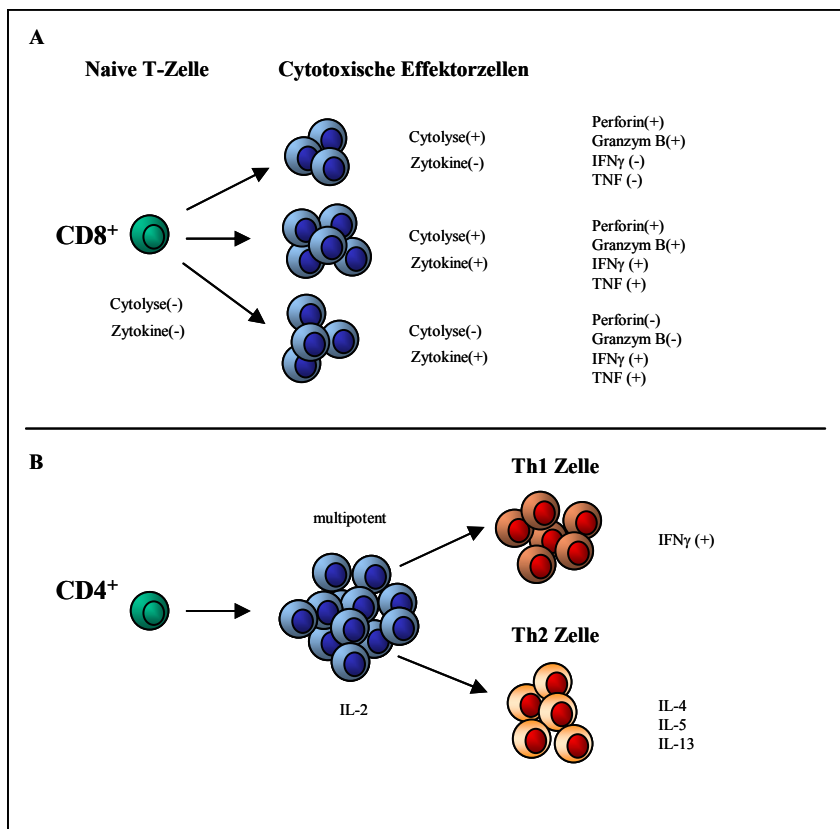


Abbildung 1.2: Die Bildung von CD4⁺ und CD8⁺ Effektorzellen

A. Naive CD8⁺ T-Zellen entwickeln sich entweder zu cytolytischen oder zu Zytokin produzierenden Zellen. B. Aktivierte CD4⁺ T-Zellen differenzieren entweder zu Th1 Zellen, die IFN γ produzieren oder zu Th2 Zellen, die bestimmte Interleukine sekretieren (modifiziert nach Seder und Ahmed, 2003).

Naive CD4⁺ T-Zellen können sich nach ihrer Aktivierung entweder in eine Th1 oder in eine Th2 T-Helferzelle entwickeln. Beide Zelltypen unterscheiden sich nach ihrer Stimulierung aufgrund der Zytokine, die sie produzieren und ihrer Effektorfunktion, die sie ausüben (Mosmann *et al.*, 1986; Mosmann und Coffman, 1989). Th1 Zellen sind auf die Aktivierung von Makrophagen spezialisiert und sekretieren Interferon γ , TNF α und Lymphotoxin (LT), wohingegen Th2 Zellen verschiedene Zytokine, wie IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren. Dies führt sowohl zur Aktivierung von B-Zellen, die spezifische Antikörper bilden, als auch zur Aktivierung von eosinophilen Zellen und spielt bei allergischen Reaktionen eine Rolle (Mosmann und Coffman, 1989; Paul und Seder, 1994). Zusätzlich zu den unterschiedlichen Zytokinprofilen der Th1 und Th2 Zellen, exprimieren sie verschiedene Oberflächenmarker. Zum Beispiel wird die IL-12R β -Kette (Szabo *et al.*, 1997), der Chemokinrezeptor CCR5 (Bonecchi *et al.*, 1998; D'Ambrosio *et al.*, 1998) und der IL-18 Rezeptor nur auf Th1 Zellen

exprimiert, während T1/ST2 (Lohning *et al.*, 1999), CCR3, CCR4 (Sallusto *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998) und ICOS (McAdam *et al.*, 2000) vermehrt auf der Oberfläche von Th2 Zellen vorkommen. Obwohl die beiden $CD4^+$ Effektorzelltypen sowohl phänotypisch, als auch funktionell verschieden sind, entstehen beide aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, der THP Zelle (Kamogawa *et al.*, 1993). In welche Richtung sich diese Vorläuferzelle differenziert, ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig, wie zum Beispiel vom Zytokinmilieu, vom Typ der Antigen präsentierenden Zelle und die Art der Kostimulation (Constant und Bottomly, 1997; Lane, 2000; Liu *et al.*, 2001; Salomon und Bluestone, 2001; Sperling und Bluestone, 2001). Eine Schlüsselrolle bei der Th1/Th2 -Differenzierung spielen die Zytokine. Experimente an gendefizienten Mäusen für $IFN\gamma$, IL-12 oder deren Rezeptoren haben gezeigt, dass diese nicht in der Lage sind, funktionelle Th1 Zellen zu bilden. Dagegen besitzen Mäuse, die kein IL-4, IL-4R oder STAT6 bilden, keine Th2 Zellen (Magram *et al.*, 1996; Piccotti *et al.*, 1998; Gessner und Rollinghoff, 2000; Wurster *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001).

Die $CD8^+$ Effektorzellen sind wichtige Mediatoren der adaptiven Immunantwort gegen Viren, Protozoen und auch gegen einige bakterielle Krankheitserreger. Cytotoxische $CD8^+$ T-Zellen töten Zielzellen, die Peptide von Pathogenen an MHC I Moleküle an ihrer Oberfläche gebunden haben (Germain, 1994). Sie sind in der Lage, eine große Auswahl verschiedener Effektormoleküle zu produzieren, die zur Bekämpfung von Pathogenen dienen. Die aktivierten $CD8^+$ T-Zellen können über unterschiedliche Mechanismen die Zytolyse von infizierten T-Zellen initiieren (Berke, 1995). Zum einen durch den Signalweg der granulären Exocytose, der von dem porenbildenden Molekül Perforin abhängig ist. Dabei wird eine effiziente Lyse durch Abgabe des Perforins und anderer granulärer Enzyme, wie Granzym A und Granzym B, in das Innere der Zielzelle ausgelöst (Heusel *et al.*, 1994; Ebnet *et al.*, 1995). Zum anderen wird der programmierte Zelltod direkt in den Zielzellen durch die Expression des CD95-Liganden (CD95L) ausgelöst. Beide Signalwege aktivieren als Antwort auf die TCR-Stimulation die Caspase Kaskade, die zum Tod der infizierten, Antigen präsentierenden Zellen führt (Shresta *et al.*, 1998). Zusätzlich produzieren $CD8^+$ Effektorzellen sowohl Zytokine, wie zum Beispiel $IFN\gamma$ und TNF, als auch bestimmte Chemokine, die dazu dienen, weitere Effektorzellen, wie Makrophagen und neutrophile Zellen, zu rekrutieren und zu aktivieren (Harty und Bevan, 1999).

Viren, Bakterien, Pilze und Protozoen können sowohl akute, als auch chronische Infektionen auslösen. Einige Viren, wie zum Beispiel das Influenza Virus, verursachen eine akute

Infektion und werden vollständig eliminiert. Im Gegensatz dazu induzieren Herpes Simplex Viren (HSV) eine latente Infektion, die ein Leben lang im Wirt persistieren kann (Whitley und Roizman, 2001). Die $CD8^+$ T-Zellen spielen verschiedene Rollen bei diesen beiden Prozessen. Influenza spezifische T-Zellen vermitteln zum Beispiel die pulmonale Virusbeseitigung durch Perforin und CD95 induzierte, zelluläre Lyse (Topham *et al.*, 1997). Kostimulatorische Moleküle wie CD28 und CD27, ein Mitglied der TNF Familie (Hendriks *et al.*, 2000), unterstützen die Immunantwort gegen das Influenza Virus. CD28 zum Beispiel, beeinflusst die $IFN\gamma$ Produktion in den infizierten Lungenzellen (Lumsden *et al.*, 2000). Auch $CD4^+$ T-Zellen beeinflussen die Influenza spezifische $CD8^+$ T-Zellantwort. Die Depletion von $CD4^+$ T-Zellen inhibiert die Rekrutierung von Virus spezifischen $CD8^+$ Zellen in die infizierten Lungen, was zu einer erheblichen Verzögerung der Virus Beseitigung führt (Zhong *et al.*, 2000).

$CD4^+$ T-Zellen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung der Erstinfektion mit Herpes Simplex Virus (Manickan und Rouse, 1995; Milligan und Bernstein, 1995; Milligan und Bernstein, 1997). Durch die Produktion von antiviralen Zytokinen oder Granzym, eine nicht lytische Serin/Threonin Kinase, halten die virusspezifischen $CD8^+$ T-Zellen HSV in einem latenten Stadium (Pereira *et al.*, 2000). Die Kostimulation durch CD28 ist auch hier essentiell für eine erfolgreiche Immunantwort (Edelmann und Wilson, 2001). Es gibt allerdings auch Infektionen, wie zum Beispiel die durch *Listeria Monocytogenes*, ein gram positives Bakterium, bei denen die $CD8^+$ Effektorzellen nicht auf die $CD4$ Kostimulation und auch nicht auf die CD28 Ligation angewiesen sind (Hamilton *et al.*, 2001; Mittrucker *et al.*, 2001). Vergleicht man zusammenfassend die $CD8^+$ T-Zellantwort gegenüber verschiedenen Pathogenen, so findet man sowohl einige Unterschiede, als auch mehrere interessante Gemeinsamkeiten. Die Kinetik der T-Zellexpansion und Kontraktion bei einer Influenza Infektion ähnelt der LCMV Infektion. Das Expansionsmaximum liegt hier bei ca. 8 Tagen. Im Gegensatz dazu findet man bei einer transienten Infektion T-Zellen, die auch ohne Antigenstimulation weiter proliferieren (Kaech und Ahmed, 2001; van Stipdonk *et al.*, 2001; Wong und Pamer, 2001). Diese Entdeckungen zeigen, dass T-Zellen in der Lage sind, programmiert zu werden. Das neue Konzept, dass die T-Zellexpansion zum Zeitpunkt der T-Zellaktivierung programmiert wird, ersetzt die traditionelle Annahme, dass die Expansion ausschließlich vom Antigen abhängig ist und endet, nachdem das Antigen *in vivo* depletiert wurde. T-Zellen werden unterschiedlich programmiert, abhängig von der Art und Weise der Antigen Präsentation und auch von der Art des Gewebes, in das die aktivierten T-Zellen einwandern.

1.2.4 Die Funktion von $\gamma\delta$ T-Zellen

Über 95 % der peripheren Lymphocyten tragen den $\alpha\beta$ TCR Komplex. Nur 2-5% der der T-Zellen sind $\gamma\delta$ positiv. Die Funktion dieser unkonventionellen Lymphocyten Population ist bis heute noch weitgehend ungeklärt. Ein auffallender Unterschied zu den $\alpha\beta$ T-Zellen ist ihre geringe Variabilität der T-Zellrezeptoren. Es wird angenommen, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen ein Teil des nicht adaptiven, früh wirksamen Abwehrsystems sind und keine klonale Expansion benötigen (Boismenu und Havran, 1997). Dies führt dazu, dass eine große Zahl von $\gamma\delta$ T-Zellen auf dasselbe Antigen reagieren und nicht wie $\alpha\beta$ T-Zellen, eine hohe Antigenspezifität besitzen. Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass $\gamma\delta$ T-Zellen auf Peptidfragmente von Pathogenen mit geringem Molekulargewicht und auf Proteine, die nach Infektion oder auf fehlregulierten Wirtszellen hochreguliert werden, mit einer polyklonalen Antwort reagieren (Chien *et al.*, 1996). In Mäusen sind $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage, MHC I verwandte T10/T22 Proteine zu binden (Crowley *et al.*, 2000; Tsujimura *et al.*, 2001). Einen großen Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen findet man im Epithelgewebe (Stingl *et al.*, 1987; Asarnow *et al.*, 1988; Goodman und Lefrancois, 1988) und es wird angenommen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen eher auf die Veränderung von Epithelzellen reagieren, als auf spezifische Eigenschaften des Erregers. Sie reagieren auf gewebespezifische Streßantigene, wie zum Beispiel auf bestimmte Hitzeschockproteine (Asarnow *et al.*, 1988; Janeway *et al.*, 1988; Hayday, 2000), die infizierte Epithelzellen exprimieren (Steele *et al.*, 2000). Ein weiterer Unterschied zu konventionellen $\alpha\beta$ T-Zellen ist die Autoreaktivität der $\gamma\delta$ T-Zellen (Tilloy *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu autoreaktiven $\alpha\beta$ T-Zellen, die durch klonale Deletion eliminiert werden, werden autoreaktive $\gamma\delta$ T-Zellen im Thymus positiv selektioniert (Rocha *et al.*, 1992; Bendelac, 1995; Lin *et al.*, 1999; Hayday und Gibbons, 2001). Studien in defizienten Mäusen für den $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor, haben gezeigt, dass $\gamma\delta$ T-Zellen eine immunregulatorische Funktion besitzen, die die $\alpha\beta$ T-Zellantwort abschwächt (Born *et al.*, 1999). Dies ist jedoch nicht immer der Fall, denn sie können auch pro-inflammatorische Effekte hervorrufen. Sie produzieren zum Beispiel $\text{IFN}\gamma$ und aktivieren so NK-Zellen (Ladel *et al.*, 1996). Untersuchungen von Cocksacki Virusinfektionen haben demonstriert, dass sowohl pro-inflammatorische, als auch anti-inflammatorische Aktivitäten der $\gamma\delta$ T-Zellen gleichzeitig vorliegen können (Huber *et al.*, 2000; Huber *et al.*, 2002).

1.2.5 Die Entstehung des immunologischen Gedächtnis

Nachdem die naiven T-Zellen in den sekundären lymphatischen Geweben durch Antigen tragende dendritische Zellen aktiviert worden sind, wird eine massive klonale Expansion von T-Effektorzellen initiiert. Das Pathogen wird dadurch normalerweise eliminiert und die Effektor T-Zellpopulation durchläuft eine erhebliche Reduktion, die zum Tod von über 90% der Zellen führt. Nur 5-10% der Antigen spezifischen Zellen überleben und bilden das sogenannte immunologische Gedächtnis, welches gegen weitere Infektionen mit demselben Erreger schützt. Eine naive T-Zelle durchläuft drei Stadien auf dem Weg zur Gedächtniszelle (Abbildung 1.3). Kurz nach der Infektion zuerst das Expansionsstadium, das einige Tage dauern kann. Dann folgt das Kontraktionsstadium, das ca. ein bis zwei Wochen dauert und zuletzt das Gedächtnisstadium, das ein Leben lang Bestand haben kann (Masopust *et al.*, 2004).

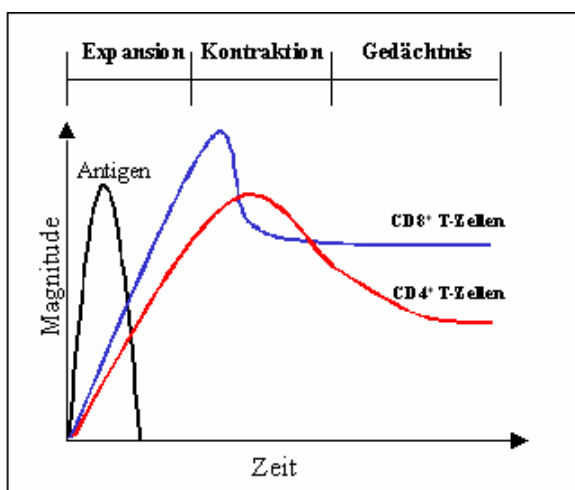


Abbildung 1.3: Die drei Phasen der Immunantwort

Die Expansion der $CD4^+$ T-Zellen ist langsamer und die Magnitude ist niedriger als bei den $CD8^+$ T-Zellen (modifiziert nach Keach *et al.*, 2002).

Gedächtnis T-Zellen unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von naiven T-Zellen. Sie sind viel sensibler gegenüber einer Antigenstimulation und reagieren daher auf viel niedrigere Antigenkonzentrationen als naive T-Zellen (Kearney *et al.*, 1994; Pihlgren *et al.*, 1996; Curtsinger *et al.*, 1998). Die ausgelöste Aktivierungsantwort ist weniger abhängig von kostimulatorischen Signalen und benötigt eine kürzere Dauer der Antigenpräsentation. Ursache dafür könnte die Tatsache sein, dass eine größere Variation von APCs für Gedächtnis T-Zellen zur Verfügung stehen. Während naive T-Zellen auf die Antigenpräsentation durch DCs angewiesen sind, können Gedächtnis T-Zellen genauso effektiv durch ruhende B-Zellen aktiviert werden (Croft *et al.*, 1994). Nach der Aktivierung, proliferieren sie schneller und erreichen viel höhere absolute Zellzahlen als aktivierte naive T-Zellen (Bruno *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 1999; Veiga-Fernandes *et al.*, 2000).

Einen weiteren Unterschied zu naiven Zellen findet man in ruhenden, teilungsinaktiven Gedächtniszellen. Diese besitzen eine größere Menge an RNA und Proteinen und befinden sich phänotypisch eher in der G₁-, als in der G₀-Phase des Zellzyklus (Stout und Suttles, 1992; Veiga-Fernandes *et al.*, 2000).

Gedächtnis T-Zellen stellen selbst eine heterogene Population dar. Basierend auf der Proliferationsrate und Expression von Aktivierungsmarkern auf ihrer Oberfläche lassen sie sich in zwei Untergruppen teilen, die man als Effektor Gedächtnis T-Zellen (T_{EM}: effector memory cells) und als zentrale Gedächtnis T-Zellen (T_{CM}: central memory cells) bezeichnet. T_{EM} Zellen ähneln Effektorzellen und befinden sich offenbar in einem aktivierten Stadium. Sie sind daher schnell aktivierbar, zeigen CTL Aktivität und exprimieren Aktivierungsmarker, wie CD69, CD25 und besitzen das CD44 Molekül auf ihrer Oberfläche (Zimmerman *et al.*, 1996; Kedl und Mescher, 1998; Yawalkar *et al.*, 2000; Hogan *et al.*, 2001). Wie typische Effektorzellen, besitzen sie eine große Menge an β 1- und β 2-Integrinen, sowie spezialisierte Chemokinrezeptoren, die es den Zellen ermöglichen, in nicht lymphatische Gewebe einzuwandern (Baron *et al.*, 1993; Sallusto *et al.*, 1999). Aktivierte Gedächtnis T-Zellen findet man im Blut und in der Milz, aber nur in geringen Mengen in den Lymphknoten, da sie ihre „Homing“ Rezeptoren CD62L und CCR7 verloren haben. Ruhende, zentrale Gedächtnis T-Zellen, exprimieren keine Aktivierungsmarker und ähneln eher naiven T-Zellen. Sie sind jedoch CD44^{hi} und exprimieren die „Homing“ Rezeptoren CD62L und CCR7, wodurch sie gezielt in die lymphatischen Gewebe eindringen können (Sallusto *et al.*, 1999). Obwohl sie sich in einer Art Ruhezustand befinden, sind sie weniger inert, verglichen mit naiven T-Zellen. Zum Beispiel konnte in CD8⁺ T_{CM} Zellen gezeigt werden, dass sie mehr RNA und konstitutiv Perforin produzieren. Gedächtnis T-Zellen sind also nicht vollständig ruhend, sondern werden vielmehr in einem niedrigen Aktivierungszustand gehalten (Bachmann *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 1999; Veiga-Fernandes *et al.*, 2000).

Die Entstehung der Gedächtnis T-Zellen ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Es existieren verschiedene Entwicklungsmodelle, die versuchen, die Differenzierung der Gedächtnis T-Zellen zu erklären. Das erste Modell geht davon aus, dass Gedächtniszellen direkte Nachkommen der Effektorzellen sind. Belegt wurde dieses Modell unter anderem durch ein Experiment, das zeigen konnte, dass markierte Virus spezifische T-Effektorzellen im Gedächtnis T-Zellpool erhalten bleiben.

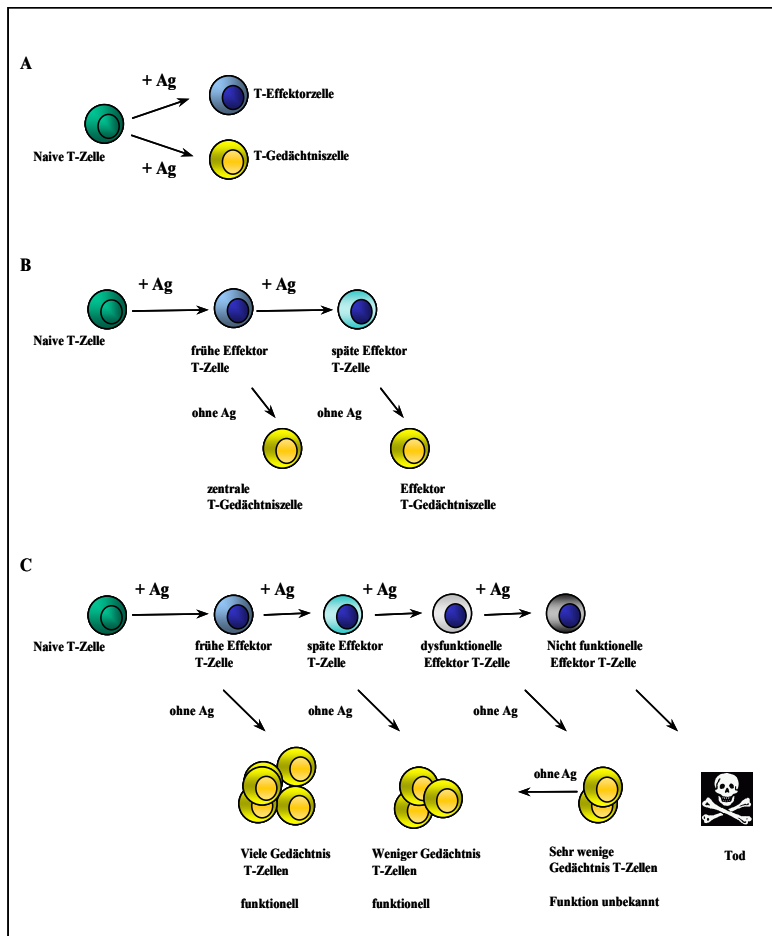


Abbildung 1.4: Die Bildung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Effektorzellen

A. Gedächtnis T-Zellen und Effektor T-Zellen entwickeln sich parallel aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle.

B. Lineare Entwicklung der Gedächtnis T-Zellen aus einer Effektor T-Zelle.

C. Das Modell des „sinkenden Potentials“. Die konstitutive Zufuhr von Antigen, wie bei einer chronischen Infektion, führt zur Verringerung der Effektorantwort; Ag: Antigen. Modifiziert nach Kaech *et al.*, 2002).

In einem weiteren Experiment wurden bestimmte T-Effektorzellen in einen Wirt transplantiert. Die nach Antigenstimulation entstandenen Gedächtnis T-Zellen waren direkte Nachkommen der zuvor transferierten Effektorzellen (Opferman *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2001). Zusätzlich konnte durch CFSE und BrdU Färbungen gezeigt werden, dass sich die Gedächtnis T-Zellen eher aus umgewandelten Effektorzellen bilden, als dass sie aus einer kleinen Subpopulation der Effektorzellen hervorgehen. Allerdings zeigen andere Studien, dass sich die Gedächtniszellen auch ohne das Durchlaufen des Effektor T-Zellstadiums bilden können. Bei diesem zweiten Modell wird davon ausgegangen, dass die naiven T-Zellen sowohl die Vorläufer für Effektor T-Zellen bilden, als auch für T_{CM} Gedächtnis T-Zellen. Aus den T_{CM} bilden sich durch eine sekundäre Stimulation mit Antigen T_{EM} Zellen (Langenkamp *et al.*, 2000; Iezzi *et al.*, 2001; Lauvau *et al.*, 2001; Manjunath *et al.*, 2001). Dies würde bedeuten, dass die Entstehung von Gedächtnis T-Zellen möglicherweise nicht linear verläuft und sich je nach Stimulationsbedingung verschiedene Untergruppen von Gedächtnis T-Zellen entwickeln. Das dritte Modell des „absinkenden Potentials“ (decreasing potential hypothesis) geht davon aus, dass die Dauer der Antigenstimulation und die Zytokinumgebung der Zellen

entscheidend für die Ausbildung dieser unterschiedlichen Populationen ist (Sallusto *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2001; Champagne *et al.*, 2001).

Zytokine spielen eine Schlüsselrolle beim Überlebensprozess von naiven und Gedächtnis T-Zellen. IL-7 ist zum Beispiel ein essentielles Zytokin für naive T-Zellen. Werden IL-7 defiziente T-Zellen in wt Mäuse transferiert, sind diese Zellen nicht in der Lage zu überleben und sterben ab (Schluns *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2001; Vivien *et al.*, 2001). IL-7 unterstützt unter anderem die homöostatische Proliferation von naiven T-Zellen, so dass der Erhalt des T-Zellpools zum einen von einem Selbst MHC Kontakt und zum anderen von der Stimulation durch das Zytokin IL-7 abhängt. Den Beweis, dass auch der Erhalt von Gedächtnis T-Zellen Zytokin abhängig ist, erbrachten Untersuchungen, die zeigten, dass die Injektion von PolyIC und Lipopolysaccharid (LPS) in Mäusen zu einer erhöhten Proliferation von CD44^{hi}CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen führte. Diese Substanzen sind nicht in der Lage, den TCR Komplex zu stimulieren, führen aber zu einer starken Produktion von Zytokinen, wie zum Beispiel IFN- α und IFN- γ . Diese TCR unabhängige Proliferation bezeichnet man als Bystander Proliferation (Tough *et al.*, 1996; Tough *et al.*, 1997). Allerdings können diese Zytokine nicht allein die Zellen zu einer derartigen Proliferation anregen. Dazu wird zusätzlich ein weiteres Zytokin, das IL-15 benötigt (Sprent *et al.*, 2000). IL-15 stellt ein direktes Stimulanz für CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen dar und ist in der Lage, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine starke Proliferation dieser Zellen hervorzurufen (Zhang *et al.*, 1998). IL-15 transgene Mäuse zeigen eine selektive Erhöhung der CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen (Marks-Konczalik *et al.*, 2000; Nishimura *et al.*, 2000), wohingegen sowohl IL-15, als auch IL-15R α defiziente Mäuse einen reduzierten CD8⁺ Gedächtnis T-Zellpool aufweisen (Kennedy *et al.*, 2000). Der Einfluss von IL-15 auf die CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen führt zu einer erhöhten Expression der IL-2R β Kette (CD122), welche einen wichtigen Rezeptor für IL-2 und auch für IL-15 darstellt (Zhang *et al.*, 1998; Ku *et al.*, 2000). Interessanterweise führt die Injektion von α IL-2 Antikörper zu einer vermehrten Proliferation dieser Zellen, was vermuten lässt, dass IL-2 normalerweise die IL-15 induzierte Proliferation inhibiert (Dai *et al.*, 2000).

Die meisten Daten und Erkenntnisse der Gedächtnis T-Zellentwicklung stammen aus Untersuchungen von CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen. Die Faktoren, die die Ausbildung und das Überleben der CD4⁺ Gedächtnis T-Zellen beeinflussen, sind weitestgehend unbekannt. Es wird angenommen, dass auch diese Zellen den Kontakt mit Zytokinen benötigen.

Welche Zytokine in diese Prozesse involviert sind ist nicht klar, wobei IL-15 ausgeschlossen werden kann, da die IL-15 defizienten Mäuse eine normale CD4⁺ Gedächtnis T-Zellpopulation aufweisen (Lodolce *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2000). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass CD4⁺ Gedächtnis T-Zellen durch bestimmte Interferone zur Bystander Proliferation angeregt werden können (Eberl *et al.*, 2000).

1.2.6 Der Mechanismus des programmierten Zelltods

Nachdem die T-Zellen die erste Phase der klonalen Expansion durchlaufen haben, gehen sie über in die Kontraktionsphase, in der über 90% der aktivierten Zellen absterben. Die Eliminierung dieser Zellen erfolgt in einem Prozess, den man als programmierten Zelltod oder auch als Apoptose bezeichnet. Die Apoptose kann durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli ausgelöst werden, wie zum Beispiel durch UV- oder γ -Strahlung, durch den Entzug von Wachstumsfaktoren und durch die Stimulation der sogenannten Todesrezeptoren. Der Prozess der Apoptose läuft in verschiedenen, genau definierten Phasen ab (Kerr *et al.*, 1972). Zunächst separieren sich die apoptotischen Zellen von ihren Nachbarzellen und es zeigt sich eine charakteristische Kondensation des Chromatins, wobei die DNA in kleine Fragmente gespalten wird (Wyllie *et al.*, 1980; Wyllie *et al.*, 1984). Während die Zellen die Apoptose durchlaufen, findet eine Membraninversion statt, bei der Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche exponiert wird (Martin *et al.*, 1995; Castedo *et al.*, 1996; Bratton *et al.*, 1997). Die Zellen beginnen die Zellmembran einzuschnüren und zu schrumpfen. Es bilden sich die sogenannten apoptotischen Körperchen (apoptotic bodies), die kondensiertes Chromatin und Zellorganellen enthalten. Phagocyten nehmen diese Körperchen auf und sorgen so dafür, dass jede apoptotische Zelle möglichst schnell, ohne eine Entzündungsreaktion hervorzurufen, entfernt wird (Krammer, 1999; Hengartner, 2001). Neben der Apoptose können Zellen auch durch Nekrose sterben. Sie tritt normalerweise nach einer Gewebsverletzung auf und ist morphologisch durch eine irreversible, osmotische Veränderung gekennzeichnet, welche mit einem Anschwellen der Zellen und einer unkontrollierten Lyse assoziiert ist. Durch die Verletzung der Zellmembran wird, im Gegensatz zu den apoptotischen Zellen, der Zellinhalt in die Umgebung abgegeben und kann dort eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Während der Nekrose findet keine Kondensation des Chromatins statt und die Degradierung der DNA verläuft eher nach dem Zufallsprinzip (Dong *et al.*, 1997).

Der programmierte Zelltod spielt bei vielen verschiedenen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle und ist zur Aufrechterhaltung der Homöostase von Geweben essentiell, wie zum Beispiel bei der fötalen Entwicklung und der Organogenese.

Die Signifikanz für das Immunsystem wurde erst in den letzten zehn Jahren eingehend untersucht. Die Apoptose übernimmt eine wichtige Rolle bei der T-Zell vermittelten Immunantwort. Man bezeichnet den Vorgang hier als AICD (Activation Induced Cell Death), da diese durch die Aktivierung der T-Zellen ausgelöst wird (Kabelitz und Janssen, 1997). Es ist jedoch möglich, Apoptose durch das Fehlen von Wachstumsfaktoren auszulösen, was man als „death by neglect“ bezeichnet. Diesen Vorgang findet man zum Beispiel bei hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks, die in der Abwesenheit bestimmter Kolonie-stimulierender Faktoren (colony stimulating factors) das apoptotische Programm einleiten (Williams *et al.*, 1990).

Eine zentrale Rolle bei der Induktion der Apoptose spielt die Interaktion des CD95-Rezeptors (FasR, Apo1, Tnfrsf6) mit dem CD95-Ligand (FasL, Apo-1L, Tnfsf6) (Trauth *et al.*, 1989; Suda *et al.*, 1996). CD95 gehört zur Superfamilie der TNF/NGF Rezeptoren (tumor necrosis factor/nerve growth factor), die man auch als Todesrezeptoren bezeichnet. Diese Rezeptoren besitzen eine intrazellulär gelegene Todesdomäne (DD: Death Domain), die zur Transduktion des apoptotischen Signals notwendig ist (Itoh und Nagata, 1993; Schulze-Osthoff *et al.*, 1998; Krammer, 1999). Die Todesrezeptoren werden durch ihre Liganden aktiviert, die der TNF Familie zugehörig sind. Die Besonderheit dieser Transmembranproteine besteht darin, dass von ihnen eine lösliche Form durch die Aktivierung bestimmter Matrix-Metalloproteinasen gebildet werden kann. Die Funktion dieser löslichen Liganden ist nicht ganz eindeutig. Zum einen konnte eine cytotoxische Aktivität des löslichen CD95L gezeigt werden (Krammer, 1999), wohingegen andere Studien zeigen, dass der CD95L sogar Apoptose inhibierend wirken kann (Suda *et al.*, 1997) (Schneider *et al.*, 1998). Der CD95L bindet entweder den CD95-Rezeptor auf der eigenen Zelloberfläche oder an den CD95-Rezeptor auf benachbarten Zellen. Durch Membraneinstülpungen oder durch die Produktion des löslichen CD95L, kann die CD95/CD95L Interaktion sowohl zum autocrinen Suicid, als auch zum paracrinen Fratricid führen (Mariani *et al.*, 1996). Die Stimulation des CD95-Rezeptors initiiert die Formation eines Multiproteinkomplexes, den man als „Tod induzierenden Signal Komplex“ bezeichnet (DISC: Death Inducing Signaling Complex,). Nach der Stimulation wird das Serin phosphorylierte Adapter Molekül FADD/Mort-1 zum oligomerisierten CD95-Rezeptor rekrutiert (Boldin *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1995). Durch die Ligandenbindung verändert sich die Konformation der intrazellulären DD, die dann FADD/Mort-1 binden kann. FADD

besitzt eine N-terminale Todeseffektordomäne (DED: Death Effector Domain), durch welche es Caspase-8/a,-8/b und CAP-3 bindet. Die Prokaspase 8 wird in drei aufeinanderfolgenden Schritten zu aktiver Caspase 8 gespalten. Die Prodomäne verbleibt am DISC, während die aktive Caspase 8 vom DISC dissoziiert und eine Kaskade von Caspasen induziert, die den apoptotischen Prozess weiter voran treiben (Salvesen, 1999). Die Caspasen gehören zu der Familie der Aspartat spezifischen Cystein-Proteasen, die für die Apoptose essentiell sind (Alnemri *et al.*, 1996). Bisher wurden zwölf humane Caspasen entdeckt (Nicholson, 1999). Sie werden als Proenzyme synthetisiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert.

In Hinblick auf die Signalübertragung nach CD95 Stimulation, können zwei unterschiedliche Zelltypen identifiziert werden; die CD95-TypI und die CD95-TypII Zellen (Scaffidi *et al.*, 1998). In CD95-TypI Zellen ist die Induktion der Apoptose durch die Aktivierung großer Mengen an Caspase 8 am DISC begleitet, wodurch Caspase 3 gespalten und so eine direkte Aktivierung der Caspase-Kaskade ausgelöst wird. Der CD95-TypII Signalweg ist von der apoptotischen Aktivierung der Mitochondrien abhängig (Kroemer, 1997; Gross *et al.*, 1999). Diese Aktivierung wird durch das pro-apoptotische Protein Bid vermittelt. Das durch Caspase 8 gespaltene Bid transloziert zu den Mitochondrien und induziert dort die Freisetzung bestimmter apoptotischer Moleküle wie zum Beispiel AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Susin *et al.*, 1996) und Cytochrom c (Liu *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1999). Im Cytosol wird dann Apaf-1 von Cytochrom c gebunden und dieser Komplex bindet wiederum Procaspase 9 (Zou *et al.*, 1997). Innerhalb dieses Komplexes, den man als Apoptosom bezeichnet, wird die Procaspase 9 in die aktive Caspase 9 umgewandelt, die dann weitere Caspasen aktiviert (Zou *et al.*, 1999). In den CD95-TypII Zellen blockiert die Überexpression von Bcl-2-Familienmitgliedern die Caspase 8 und Caspase 3 Aktivierung und damit die Apoptose (Schmitz *et al.*, 2000). Die Mitglieder der Bcl-2 Familie gehören zu den Apoptose regulierenden Proteinen. Die einzelnen Proteine können in pro-apoptotische, wie zum Beispiel Bax und Bak und in anti-apoptotische Gruppen, wie zum Beispiel Bcl-2 und Bcl-x eingeteilt werden (Gross *et al.*, 1999; Vander Heiden und Thompson, 1999). Der apoptotische Prozess der peripheren T-Zellen während der Kontraktionsphase der Immunantwort wird durch zwei Hauptsignalwege gesteuert. Einer dieser Wege läuft über die Todesrezeptoren und wird durch die Restimulation des TCR/CD3 Komplexes durch die Bindung eines Antigens oder durch spezifische Antikörper gegen die CD3 Kette ausgelöst (Bensussan *et al.*, 1990; Janssen *et al.*, 1991; Russell *et al.*, 1991; Janssen *et al.*, 1992). *In vitro* führt die Reaktivierung der T-Zellen zur Expression von CD95L, was zur Eliminierung benachbarter CD95 positiver

Zellen oder zum Suicid führt (Klas *et al.*, 1993; Singer und Abbas, 1994; Janssen *et al.*, 2000). Das Zytokin IL-2, welches essentiell für die Proliferation und das Überleben der aktivierten T-Zellen ist, spielt auch eine wichtige Rolle bei der Prästimulation der T-Zellen für die Apoptose (Lenardo, 1991). IL-2 bewirkt, dass die T-Zellen sensibler für apoptotische Stimuli werden. IL-2 bzw. IL-2R defiziente Mäuse akkumulieren aktivierte T-Zellen und entwickeln eine Autoimmunität, was vermuten lässt, dass IL-2 eine entscheidende Rolle bei der Termination der Immunantwort spielt. Zusätzlich sind diese defizienten Mäuse resistent gegenüber CD95 induzierter Apoptose (Kneitz *et al.*, 1995; Van Parijs *et al.*, 1997). Der zweite Hauptsignalweg der Apoptose in den peripheren T-Zellen ist von den Todesrezeptoren unabhängig und wird durch das Fehlen bestimmter Zytokine während der Terminationsphase der Immunantwort ausgelöst (Duke und Cohen, 1986). Durch das Fehlen der weiteren Antigenstimulation verlieren die T-Zellen ihre IL-2 Produktion und dessen Rezeptor, was zum Absinken des Zytokin Niveaus führt. Durch den geringen Zytokin Level wird das pro-apoptotische Molekül Bim aktiviert (Bouillet *et al.*, 1999; Puthalakath *et al.*, 1999). „death by neglect“ kann durch die Überexpression von Bcl-2 Familienmitgliedern inhibiert werden (Strasser *et al.*, 1991; Strasser *et al.*, 1995).

1.3 Das Friend Virus Modell

Das Friend Virus wurde 1957 von Charlotte Friend entdeckt. Es gehört zu den murinen Retroviren und verursacht in Mäusen eine Krankheit, die mit einer massiven Vergrößerung der Milz einhergeht und in späteren Stadien, aufgrund der Ausbildung einer Erythroleukämie, zum Tod der Mäuse führt (Friend, 1957). In den letzten Jahren hat sich das Friend Virus Modell als sehr hilfreich bei der Untersuchung des mehrstufigen Prozesses der Krebsentstehung herausgestellt. Hinzu kommt, dass die transformierten Erythroblasten (MELs) ein gutes Modellsystem für die Studien der Erythrocyten Differenzierung und der Erythropoietin (Epo) vermittelten Signaltransduktion darstellen.

Nach der Infektion von Mäusen mit dem Friend Virus Komplex, durchläuft die Krankheit zwei Stadien (Ben-David und Bernstein, 1991; D'Andrea, 1992). Im ersten Stadium kommt es zu einer polyklonalen Proliferation von Erythroblasten, was zu einer erheblichen Vergrößerung der Milz führt. Diese Erythroblasten sind allerdings nicht vollständig transformiert, so dass die Transplantation dieser Zellen in eine gesunde Empfängermaus keine

Bildung von Tumoren zur Folge hat (Wendling *et al.*, 1981). Das erste mitogene Ereignis während dieser polyklonalen Proliferation ist eine konstitutive Aktivierung des Epo Rezeptors (EpoR) (Li *et al.*, 1990; D'Andrea, 1992). Im zweiten Stadium, ca. 20 Tage nach der Infektion, kommt es zur vollständigen Transformation der Zellen in der Milz, im Blut, in der Leber und auch im Knochenmark. Diese Zellen bilden Tumore *in vivo* und führen zu der Entstehung stabiler Zelllinien *in vitro* (Mager *et al.*, 1980; Mager *et al.*, 1981; Wendling *et al.*, 1981). Die meisten der entstandenen, transformierten Zellen sind nicht in der Lage p53 zu exprimieren oder sie exprimieren eine mutierte inaktive Form des Proteins, was vermuten lässt, dass p53 eine zentrale Funktion bei der Entstehung der Erythroleukämie spielt (Mowat *et al.*, 1985; Ben David *et al.*, 1988; Munroe *et al.*, 1990). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Insertion des Provirus in den genetischen Locus des transkriptionellen Aktivators Sfpi1/PU.1 (spleen focus forming virus proviral integration 1) in 70%-90% der Zellen zur Aktivierung dieses Faktors führt und dass das so aktivierte Sfpi1/PU.1 die Ausbildung der Erythroleukämie begünstigt (Moreau-Gachelin *et al.*, 1988; Paul *et al.*, 1989).

Der Friend Virus Komplex besteht aus zwei Viren, ein replikationsfähiger „Friend Helfer“ Virus (F-MuLV) und ein replikationsdefekter SFFV. Im Gegensatz zu anderen akuten, onkogenen Retroviren, kodiert das SFFV kein konstitutiv aktives Onkogen, sondern es beinhaltet eine trunkierte Form des viralen Hüllproteins gp55. Dieses Protein ist in der Lage, an den Epo Rezeptor zu binden und diesen zu aktivieren (Hoatlin *et al.*, 1990). Eine Vielzahl von verschiedenen Genen konnten identifiziert werden, die die Anfälligkeit von Mäusen für die FV induzierte Erythroleukämie beeinflussen. Basierend auf der Art der Resistenz die sie vermitteln, werden sie in verschiedene Kategorien eingeteilt. Ein wichtiges Gen, das die Proliferation der SFFV infizierten Erythroblasten beeinträchtigt ist *Fv2* (Lilly, 1970). Dieses Gen, auch *Ron* genannt (Persons *et al.*, 1999), kodiert für die Stk Rezeptor Tyrosin Kinase, deren natürlich vorkommende trunkierte Form (SF-Stk), für die Empfindlichkeit gegenüber der FV induzierten Erythroleukämie verantwortlich ist. SF-Stk zusammen mit gp55 führt zur Aktivierung des EpoR, wobei der genaue Mechanismus noch nicht bekannt ist (Herley MT, 1999). Die Anfälligkeit für die Leukämie Entstehung durch den *Fv2* Locus ist in den meisten Inzucht Mausstämmen vorhanden. Eine Ausnahme stellen C57Bl/6 Mäuse dar. Aufgrund einer Deletion im *Fv2* Gen exprimieren sie kein SF-Stk, was zur Folge hat, dass die gp55 vermittelte EpoR Aktivierung verlangsamt wird. Diese Mäuse sind resistent gegenüber einer Friend Virus induzierten Erythroleukämie (Dietz und Rick, 1972).

Um eine Infektion mit dem Friend Virus erfolgreich zu bekämpfen ist es wichtig, dass eine entsprechende Immunantwort sehr schnell eingeleitet wird. Es existieren verschiedene immunologische und auch nicht immunologische Resistenzmechanismen, die dazu führen, dass das Virus bekämpft wird. Die immunologische Resistenz vermitteln vier MHC (H2) Gene (Lilly, 1968; Chesebro und Wehrly, 1978; Miyazawa *et al.*, 1992; Perry *et al.*, 1994) und ein nicht MHC Gen Rfv-3 (Chesebro und Wehrly, 1979), welches die Produktion von Virus neutralisierenden Antikörpern beeinflusst. Zusätzlich gibt es sechs Gene (Fv-1 bis Fv-6), die eine nicht immunologische Resistenz vermitteln (Chesebro *et al.*, 1990; Ben-David *et al.*, 1991; Hoatlin und Kabat, 1995). Ein weiterer wichtiger Faktor für die FV spezifische Immunität ist die CTL Antwort der CD8⁺ T-Lymphocyten. Diese cytotoxischen T-Zellen erkennen ein Epitop des viralen gag Proteins (Greenberg und Cheever, 1985; Klarnet *et al.*, 1989; Kondo *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996) und die CTL Antwort korreliert mit einer reduzierten Milzvergrößerung und der direkten Lyse der FV infizierten Zellen (Robertson *et al.*, 1992). Aber nicht nur die CD8 Antwort spielt eine wichtige Rolle, sondern auch eine effektive CD4⁺ T-Zellproliferationsantwort (Britt und Chesebro, 1983; Miyazawa *et al.*, 1988; Chesebro *et al.*, 1990). FV spezifische CD4⁺ T-Zellen unterstützen die CTL Funktion (Hasenkrug *et al.*, 1995; Hasenkrug *et al.*, 1996) und die Immunantwort der B-Zellen (Robertson *et al.*, 1992; Perry *et al.*, 1994). Sie können möglicherweise auch selbst antiviral wirken, da die *in vivo* Depletion der CD4⁺ T-Zellen zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Virusantwort führt (Robertson *et al.*, 1992).

1.4 Der pal-1 Lokus

Die Infektion von Mäusen mit dem nicht-akut transformierenden Moloney murine Leukemia Virus (MoMuLV) hat sich als nützliche Methode zur Identifikation von Genen, die in der Tumorentstehung eine Rolle spielen, herausgestellt. Die Insertion des Provirus in bestimmte genomische Bereiche (Promotor- oder Enhancer-Regionen) kann zu einer Aktivierung benachbarter Gene führen, die nun unter dem Einfluss der retroviralen Transkriptions-Kontrollelemente stehen. Alternativ kann eine Insertion des Provirus in Exon/Intron Regionen eines Gens das Splicen der RNA und den Leserahmen eines Gens zerstören (van Lohuizen und Berns, 1990; Habets *et al.*, 1994). Die Analyse der genomischen DNA aus T- und B-Zelltumoren von MoMuLV infizierten c-Myc und Pim-1 transgenen Mäusen, führte zur Identifikation einer retroviralen Insertionsstelle, die als pal-1 bezeichnet wurde (van Lohuizen *et al.*, 1991; Scheijen *et al.*, 1997). Die genauere Untersuchung des pal-1 Lokus zeigte, dass

sich in dieser genomischen Region zwei Gene befinden, Gfi1 und Evi5, die in unabhängigen retroviralen Infektionsexperimenten als Integrationsstellen entdeckt wurden (Abbildung 1.5).

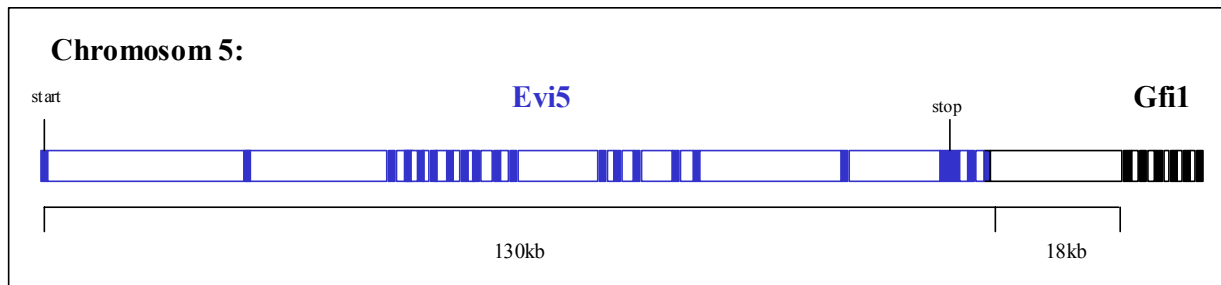


Abbildung 1.5: Der pal-1Lokus

Dargestellt ist ein Ausschnitt der genomischen pal-1 Region, die den Evi5 und Gfi1 Locus überspannt. Evi5 besteht aus 20 Exons, wobei die ersten 18 Exons kodierend sind. Gfi1 befindet sich 18kb „downstream“ von Evi5.

Das Evi5 Gen (ecotropic viral integrationsite 5) wurde als provirale Integrationsstelle des MoMuLV in T-Zell Tumoren infizierter AKXD Inzucht Mäuse entdeckt (Liao *et al.*, 1995). Die Insertion des Provirus verkürzte den kodierenden genomischen Bereich, so dass angenommen werden konnte, dass der Verlust des intakten Evi5 Proteins für die Entstehung der T-Zell Tumore von Bedeutung sein könnte und es sich bei Evi5 um ein potentiell Tumor-suppressorgenes handelt. Es existiert ebenfalls ein menschliches Evi5 Homolog (NB4S), das bei der Entstehung kindlicher Neuroblastome eine Rolle spielt. In diesen Tumoren wurde eine Chromosomentranslokation gefunden, die den NB4 Genlocus umgruppiert (Roberts *et al.*, 1998a; Roberts *et al.*, 1998b). Die Analyse der Proteindomänenstruktur von Evi5 zeigt Homologien zum humanen Tre2 Onkogen und zu bestimmten Zellzyklusregulatoren der Hefe (Liao *et al.*, 1997). Der genomische Evi5 Locus befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum Gfi1 Gen (18kb „upstream“ von Gfi1) und es konnte gezeigt werden, dass die Insertion des Provirus in den Evi5 Locus zu einer gesteigerten Gfi1 Expression in den untersuchten T-Zelltumoren führte (Schmidt *et al.*, 1996; Scheijen *et al.*, 1997).

Das Gfi1 Gen (Growth factor independence 1) wurde als provirale Insertionsstelle in Nb4 Ratten Lymphomzellen gefunden, die zuvor mit dem Moloney Maus Leukämie Virus infiziert worden sind. In diesem retroviralen Screening Experiment sollten Signalwege innerhalb der T-Zellen entdeckt werden, die unabhängig vom Wachstumsfaktor IL-2 induziert werden. Diejenigen Zellklone, die ohne externe Zugabe von IL-2 in der Kultur gewachsen sind, wurden isoliert und hinsichtlich viraler Integrationen untersucht. Eine häufige Insertionsstelle war das Gfi1 Gen, das durch den Provirus konstitutiv in diesen Zellen aktiviert war (Gilks *et al.*, 1993). Weitere Zellkulturstudien konnten zeigen, dass eine Gfi1 Überexpression dazu

führt, dass die T-Zellen von der G₁-Phase in die S-Phase des Zellzyklus übergehen können (Grimes *et al.*, 1996) und dass für die Proliferation der T-Zellen kein weiteres IL-2 benötigt wird (Zörnig *et al.*, 1996).

Etwas später wurde ein weiteres retrovirales Infektionsexperiment mit MoMuLV in L-Myc/Pim-1 doppelt transgenen Mäusen durchgeführt, um neue Onkogene zu identifizieren, die mit Pim oder Myc bei der malignen Transformation kooperieren. Auch hier wurde Gfi1 als eine der häufigsten Integrationsstellen in den entstandenen T-Zell Lymphomen als konstitutiv aktiviertes Gen gefunden (Schmidt *et al.*, 1996; Zörnig *et al.*, 1996; Scheijen *et al.*, 1997). Ein weiterer Beleg für das onkogene Potential von Gfi1 ist die spontane Entstehung von T-Zelltumoren in transgenen Lck-Gfi1 Mäusen, die Gfi1 konstitutiv in T-Zellen überexprimieren (Schmidt *et al.*, 1998a).

Gfi1 ist ein nukleärer Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der in zwei unterschiedlichen Isoformen, einer 55kDa und einer 47kDa Form, abhängig vom Zell- oder Gewebetyp exprimiert wird. Das 47kDa große Protein findet man nur im Thymus und dort hauptsächlich in den doppelt negativen Thymocyten. Die 55kDa Isoform wird neben der Expression in der Milz und im Knochenmark, auch im Thymus in denselben Zellen gebildet, wobei die Expression in den doppelt positiven T-Zellen viel stärker ist (Yücel *et al.*, 2004). Gfi1 gehört zu einer Proteinfamilie, zu der auch das Gfi1 Homolog Gfi1b, sowie die Proteine Snail und Slug gehören (Grimes *et al.*, 1996; Zweidler-Mckay *et al.*, 1996). Alle Proteine dieser Familie besitzen am C-Terminus sechs C₂-H₂ Zinkfinger und am N-Terminus eine „SNAG“ (SNAIL/Gfi1) Domäne, die unter anderem für die nukleäre Lokalisation verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass Gfi1 in der Lage ist, DNA sequenzspezifisch zu binden und dass die minimale *Core* Sequenz der Bindungsstelle die Basen „AATC“ sind. Für diese DNA Bindung ist der dritte, vierte und fünfte Zinkfinger essentiell (Zweidler-Mckay *et al.*, 1996). Die Rolle der übrigen drei Zinkfinger ist noch unklar, wobei man annimmt, dass sie für Protein/Protein Interaktionen verantwortlich sein könnten. Reporter-Experimente mit synthetischen Gfi1 Bindestellen konnten die transkriptionelle Repressoraktivität von Gfi1 zeigen, die sowohl von der DNA Bindung, als auch von einer intakten „SNAG“ Domäne abhängig ist (Grimes *et al.*, 1996; Zweidler-Mckay *et al.*, 1996). Der genaue Mechanismus über den Gfi1 seine Repressoraktivität vermittelt, ist noch weitestgehend unbekannt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Gfi1 in der Lage ist, den Korezeptor ETO *in vivo* und *in vitro* zu binden (McGhee *et al.*, 2003). ETO wurde erstmals in Zusammenhang mit der akuten myeloiden Leukämie gefunden, die mit einer t(8;21) Translokation assoziiert ist

(Miyoshi *et al.*, 1991; Miyoshi *et al.*, 1993; Erickson *et al.*, 1994), bei der ein chimäres AML-1/ETO Protein gebildet wird, welches die normale Funktion von AML-1 stört (Frank *et al.*, 1995; Meyers *et al.*, 1995; Okuda *et al.*, 1996). ETO ist zu gewissen Teilen mit der nukleären Matrix assoziiert und auch für Gfi1 konnte eine derartige Lokalisation gezeigt werden. Bei der Koexpression von Gfi1 in humanen Zellen wurde außerdem eine Interaktion von Gfi1 mit den Histon Deacetylasen HDAC-1, HDAC-2 und HDAC-3 gefunden, was vermuten lässt, dass Gfi1 seine transkriptionelle Repressoraktivität über Chromatinmodifikation vermittelt (McGhee *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zur transkriptionellen Repremierungs-Regulation konnte gezeigt werden, dass Gfi1 mit PIAS3 interagiert (Rödel *et al.*, 2000), welches die aktivierte Form des Transkriptionsfaktors STAT3 binden kann und so dessen transkriptionelle Transaktivatoraktivität herabsetzt (Chung *et al.*, 1997). Durch die Bindung von Gfi1 an PIAS3 wird die STAT3 Antwort verstärkt. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass Gfi1 eine Rolle in bestimmten Zytokin abhängigen Signalwegen spielt, da STAT3 durch eine Reihe von Zytokinen aktiviert wird, wie zum Beispiel IL-2, IL-6, IL-10 und G-CSF. Aber nicht nur die IL-6/STAT3 vermittelte Proliferationsantwort nach Antigenstimulation (Rödel *et al.*, 2000), sondern auch die IL-4/STAT6 abhängige Th2 T-Zellproliferation wird durch Gfi1 reguliert (Zhu *et al.*, 2002).

Gfi1 ist ein wichtiger Schlüsselfaktor für die T-Zellentwicklung. RNA und Proteinanalysen in transgenen Lck-Gfi1 Mäusen oder in T-Zelllinien zeigen eine starke Proteinexpression des Transkriptionsfaktors schon zu Beginn der T-Zellreifung in den doppelt negativen (DN) Thymocyten (Scheijen *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1998b), in denen die β -Selektion stattfindet. Untersuchungen an Lck-Gfi1 transgenen Mäusen zeigen eine Entwicklungsstörung während der β -Selektion, die zu einer verminderten Menge an L-Zellen (große Zellen der DN3 Population) führt. Dies hat zur Folge, dass auch weniger CD4/CD8 einzelpositive reife T-Zellen vorhanden sind (Schmidt *et al.*, 1998b). Die Untersuchung von Gfi1-defizienten Mäusen konnten die zuvor gefundenen Ergebnisse bestätigen. Der Verlust von Gfi1 führt zu einer erheblichen Verkleinerung des Thymus und damit zu einer Reduktion der T-Zellen in diesen Mäusen. Grund für die verminderte Zellzahl ist eine erhöhte Apoptoserate und ein Differenzierungsdefekt in den frühen c-kit⁺/DN Populationen. Auch die β -Selektion ist in den Gfi1-defizienten Mäusen beeinträchtigt. Es zeigt sich hier der gegenteilige Effekt wie in den Lck-Gfi1 transgenen Tieren, da in diesem Fall die Population der L-Zellen angereichert ist. Es

stellte sich heraus, dass eine weitere wichtige Funktion von Gfi1 die Regulation der positiv/negativ-Selektion ist, denn in den Gfi1 Knock Out (KO) Mäusen ist die CD4/CD8 Rate verändert und es bilden sich deutlich mehr CD8⁺ T-Zellen (Yücel *et al.*, 2003). Das Expressionsniveau von Gfi1 ist in reifen SP Thymocyten im Vergleich zu den unreifen DN und DP Populationen relativ niedrig. Erst nachdem sie den Thymus verlassen und in der Peripherie auf ihr Antigen treffen wird die Gfi1 Expression induziert (Karsunky *et al.*, 2002a; Yücel *et al.*, 2004).

Spätere Untersuchungen einer weiteren gentechnisch veränderten Gfi1:GFP Knock-In Maus, die im Labor von Prof. T. Möröy generiert wurde, konnten den Knock Out (KO) Phänotyp bestätigen. In dieser Mausmutante wurde die Gfi1 cDNA durch die GFP cDNA unter Beibehaltung des Leserahmens und der 5' und 3'regulatorischen Elemente ersetzt. Die Expression und die Fluoreszenz des GFPs gibt unter diesen Bedingungen das Expressionsmuster des Gfi1 Proteins wieder und ermöglicht so eine genaue Untersuchung Gfi1 exprimierender Zellen. Interessanterweise wurde in homozygoten Gfi1:GFP Knock-In Mäusen eine höhere GFP Fluoreszenz gefunden, als in den Gfi1:GFP heterozygoten Mäusen. Dieser Befund deutete auf einen möglichen Autoregulationsmechanismus hin. Um diese Annahme zu bestätigen wurden T-Zellen aus Lck-Gfi1/Gfi1:GFP doppelt transgenen Mäusen untersucht. In diesen Zellen konnte eine deutliche Verringerung der Fluoreszenzstärke gemessen werden, was die These der Autoregulation von Gfi1 bestätigte. Zusätzlich konnte in Chromatin-Immunopräzipitationen gezeigt werden, dass Gfi1 an den eigenen Promotor binden kann (Yücel *et al.*, 2004).

Gfi1 ist nicht nur ein regulatorisches Protein der T-Zellentwicklung, sondern erfüllt auch eine wichtige Funktion bei der Differenzierung myeloider Zellen. Gfi1^{-/-} Mäuse zeigen eine ausgeprägte Neutropenie, was bedeutet, dass keine reifen neutrophilen Granulocyten vorhanden sind. Außerdem kommt es zu einer Anreicherung unreifer monocytärer Zellen (Karsunky *et al.*, 2002b; Hock *et al.*, 2003), die als Monocytose bezeichnet werden kann. Stimuliert man Gfi1^{-/-} Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mit G-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), so sind sie nicht in der Lage, zu reifen Granulocyten zu differenzieren (Karsunky *et al.*, 2002b). Kürzlich wurden in Neutropeniepatienten zwei Mutationen im Gfi1 Gen gefunden, die zu einer Überexpression von Ela2 (Encoding Neutrophil Elastase) führen. Heterozygote Mutationen in Ela2 sind eine der häufigsten Ursachen für die Entstehung von bestimmten Neutropenie Erkrankungen (SCN: Severe

Congenital Neutropenie) (Dale *et al.*, 2000). Beide Gfi1 Mutationen liegen in der Zinkfingerregion, wobei die Mutation im fünften Zinkfinger die DNA Bindung von Gfi1 beeinträchtigt (Person *et al.*, 2003).

Das Gfi1^{-/-} Mausmodell hat klar gezeigt, dass Gfi1 eine entscheidende Rolle in verschiedenen Prozessen der Hämatopoese spielt. Der Transkriptionsfaktor ist nicht nur für die Reifung und Funktion von bereits differenzierten Zellen zuständig, sondern er kontrolliert auch wichtige Prozesse zu sehr viel früheren Zeitpunkten im Knochenmark. Gfi1 wird dort in verschiedenen Vorläuferzellen, zum Beispiel in den hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), in allgemeinen lymphoiden Vorläuferzellen (CLPs) und in granulocytären/monocytären Vorläuferzellen (GMPs) exprimiert. Es konnte allerdings keine Expression in allgemeinen myeloiden (CMPs) oder in myeloiden/erythroiden Vorläuferzellen (MEPs) gefunden werden. Der Verlust von Gfi1 führt zu einer veränderten Zusammensetzung dieser Vorläuferpopulationen. Die CLP Population ist signifikant erniedrigt, wobei dieser Effekt bei der CMP Population nicht so ausgeprägt ist und die Zellzahl der GMP Population im Vergleich zu wt Mäusen stark erhöht ist. Gfi1 ist ein wichtiger Faktor, der die Fähigkeit der Stammzellen zur Selbsterneuerung beeinflusst (Zeng *et al.*, 2004). Diese Fähigkeit wird von der Regulation des Zellzyklus gesteuert. Der Verlust von p21, einem Zellzyklusinhibitor, führt zur gesteigerten Proliferation der Stammzellen und eine Folge daraus ist ein vermindertes Selbsterneuerungspotential der Zellen (Cheng *et al.*, 2000). Die Gfi1^{-/-} Mäuse zeigen ein verändertes Proliferationsverhalten der HSCs. Es befinden sich viel weniger Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus und der Hauptanteil der Zellen ist replikationsaktiv (Zeng *et al.*, 2004). Die Gfi1-defizienten Mäuse besitzen damit einen ähnlichen Phänotyp wie die p21^{-/-} Mäuse.

Neben den facettenreichen Aufgaben, die der Transkriptionsfaktor Gfi1 im gesamten hämatopoetischen System übernimmt, gibt es weitere beschriebene Funktionen in völlig anderen Geweben, wie zum Beispiel in der Lunge, im zentralen Nervensystem und in sensorischen Epithelien. Es existieren Hinweise, dass Gfi1 eine Rolle bei der Entstehung von bestimmten Lungentumoren spielen könnte. (Kazanjan *et al.*, 2004). In Lungenkrebs-Zelllinien mit neurokrinem Phänotyp konnte eine Gfi1 Expression nachgewiesen werden. Eine Überexpression von Gfi1 führt in diesen Zellen zur raschen Tumorentwicklung. Eine weitere erstaunliche Entdeckung war die Taubheit der Gfi1-defizienten Mäuse, die durch eine Fehlentwicklung der Haarzellen des Innenohrs verursacht wird (Wallis *et al.*, 2003; Hertzano *et al.*, 2004).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, die Funktionen von Gfi1 und Evi5, die sich beide innerhalb der retroviralen MoMuLV Integrationsstelle pal-1 befinden, in peripheren T-Zellen zu untersuchen. Mit Hilfe von Gfi1-defizienten Mäusen, die zuvor im Labor von Prof. T. Möröy hergestellt worden sind und von Evi5-defizienten Mäusen, die während dieser Promotionsarbeit generiert werden sollten, sollte die Rolle dieser Proteine innerhalb verschiedener T-Zellpopulationen der Milz und der zervikalen Lymphknoten untersucht werden.

Dazu sollten T-Zellen aus Milz und Lymphknoten von wildtyp, Evi5- und Gfi1-Knock Out Mäusen isoliert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenproteine gefärbt werden. Die Analyse der so markierten Zellen und die Darstellung der unterschiedlichen Zellpopulationen sollte mittels Durchflusszytometrie erfolgen. Zusätzlich sollte *in vivo* und *in vitro* die Aktivierung, Proliferation und Apoptose der T-Zellen untersucht werden. Dazu sollten die isolierten T-Zellen mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert, mit Antikörpern gegen den Korezeptor CD3 und CD28 stimuliert und eine primäre T-Zellkultur angelegt werden. Die Analyse und das Verhalten der Zellen sollte an unterschiedlichen Zeitpunkten in einer Zeitreihe analysiert werden. Zur Untersuchung der Zellproliferation sollten verschiedene Färbemethoden angewendet werden. *In vivo* sollte mit Hilfe von wildtypischen oder Evi5- bzw. Gfi1-defizienten TCR-transgenen Mäusen, die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen untersucht werden. Dazu sollten diese Zellen mit dem jeweiligen spezifischen Antigen für den bestimmten TCR aktiviert werden.

Durch virale Infektionsexperimente mit dem „Friend Leukemia Virus“ sollte die Funktion von Gfi1 und Evi5 während der T-Zellantwort *in vivo* charakterisiert werden. Weiterhin sollte das Genexpressionsprofil von naiven, peripheren T-Zellen mit dem von Antigen stimulierten Zellen, hinsichtlich der Expressionsunterschiede bestimmter Gene in wildtyp und Gfi1- bzw. Evi5- Knock Out T-Zellen verglichen werden. Hierbei sollte die DNA-Array Technologie eingesetzt werden. Um einzelne, im DNA-Array erhaltene, putative Zielgene näher zu charakterisieren, sollte die Expression der Gene zu bestimmten Zeitpunkten nach TCR-Stimulation durch *Real Time* PCR untersucht werden. So sollte unter anderem die Rolle von Gfi1 und Evi5, die sie während der Aktivierung der T-Zellen spielen, näher bestimmt werden.

2 Ergebnisse

2.1 Herstellung Evi5-defizienter „Knock Out“ Mäuse

Um die Funktion des Evi5 Proteins bei der Entstehung von T-Zelltumoren zu untersuchen wurde eine Evi5-defiziente Maus hergestellt. Da das Evi5 Gen einen sehr großen (130kb) genomischen Bereich überspannt, war es nicht möglich das gesamte Evi5 Gen zu deletieren. Für die Herstellung des Rekombinationsvektors wurden 5' und 3' homologe Regionen gewählt, die zu einer Deletion der kodierenden Exone 3-8 führten, die einen Bereich von 10kb überspannen. Somit wurde sichergestellt, dass ein großer Teil des Evi5 Gens zerstört wird. Das genomische DNA-Material des Evi5 Locus der 5' und 3' homologen Regionen wurde aus einer genomischen Phagenbank isoliert. Abbildung 2.1 zeigt die schematische Darstellung des Rekombinationsvektors und die zur Inaktivierung verwendete Rekombinationsstrategie.

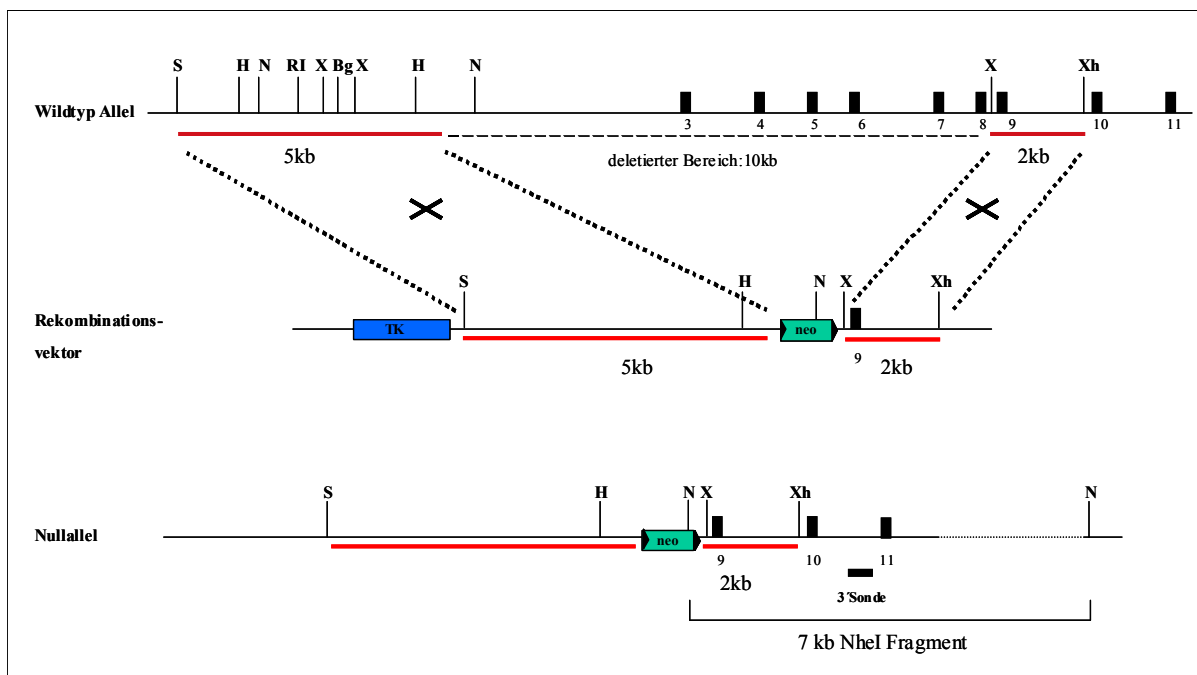


Abbildung 2.1: Strategie zur Inaktivierung des Evi5 Gens

Im oberen Teil befindet sich die schematische Darstellung eines Ausschnittes der wildtypischen, genomischen Evi5 Region. Gezeigt sind als rote Linien die 5' (5kb) und 3' (2kb) homologen Regionen, die zur Rekombination verwendet wurden. Die schwarzen Kästchen stellen die Exons 3-11 dar. Die gestrichelte, dünne schwarze Linie markiert den, durch die homologe Rekombination, deletierten genomischen Bereich von 10 kb. Die dicken gestrichelten Linien und Kreuze stellen das Rekombinationsereignis zwischen den homologen Bereichen des wt Allels und des Rekombinationsvektors dar. Im mittleren Teil befindet sich die schematische Darstellung des Rekombinationsvektors. Blau dargestellt ist die Thymidinkinase (TK) Expressionskassette des Herpes Simplex Virus und grün dargestellt ist die, durch zwei loxP Erkennungssequenzen flankierte, Neomycin Expressionskassette. Das durch die homologe Rekombination entstandene Nullallel ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Zur Detektion homologer Rekombinationsereignisse wurde ein DNA Fragment als 3' Sonde verwendet, dass nach NheI Verdau der ES-Zell DNA auf dem Nullallel ein 7kb und auf dem wt Allel ein 15kb großes Fragment erkennt. Restriktionsschnittstellen: S:SacI; H:HindIII; N:NheI; RI:EcoRI; X:XbaI; Bg:BglII; Xh:XhoI.

Für die Transfektion des Rekombinationsvektors wurden R1 ES-Zellen verwendet, die sich vom Mausstamm 129/Sv x 129/Sv-CP ableiten (Nagy *et al.*, 1990). Für den Nachweis der homologen Rekombination in ES Zellklonen wurde die ES-Zell DNA mit NheI geschnitten und auf Southern Blots mit einer 3'DNA-Sonde, die außerhalb des rekombinierten Bereichs lag, hybridisiert. Diese Sonde detektiert ein wt Fragment von 15kb und ein homolog rekombiniertes Fragment von 7kb. Insgesamt wurden drei unabhängige, homolog rekombinierte ES-Zellklone (Klon:7; 54 und 77) generiert. In Abbildung 2.2a ist exemplarisch eine Southern Blot Analyse des Klons:77 gezeigt.

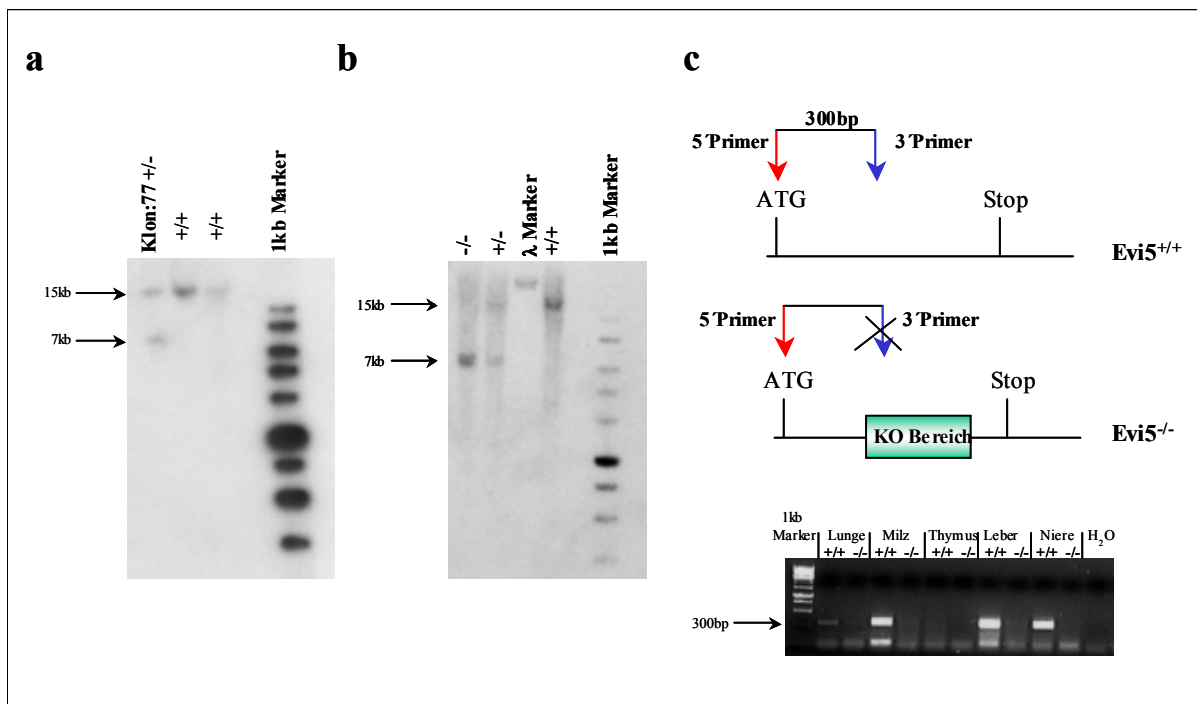


Abbildung 2.2: Nachweis der homologen Rekombination auf DNA und RNA Ebene

(a) Southern Blot Analyse (NheI Verdau und Hybridisierung mit 3'Sonde) eines der homolog rekombinierten ES-Zellklone (Klon:77) und zweier nicht homolog rekombinierter Klone (+/+). Die Analyse des rekombinierten Klons zeigt zusätzlich zur 15kb wt Bande ein zweites Signal bei 7kb, welches durch die homologe Rekombination entstanden ist. (b) Southern Blot Analyse der Schwanzbiopsien von wt, heterozygoten *Evi5*^{+/-}, und homozygoten *Evi5*^{-/-} Mäusen. (c) Der Nachweis der *Evi5*-Defizienz auf RNA Ebene erfolgte durch RT-PCR auf cDNAs verschiedener Gewebe. Im oberen Bereich befindet sich eine schematische Darstellung der, für die RT-PCR, verwendeten Primer und deren Lokalisation auf *Evi5* cDNA.

Alle drei ES-Zellklone wurden in Blastozysten von C57Bl/6 Mäusen von Wojciech Wegrzyn (AG Möröy, Institut für Zellbiologie) injiziert und anschließend in scheinsschwangere Ammenmütter transplantiert. Die Männchen der so entstandenen chimären Mäuse wurden mit C57Bl/6 Weibchen verpaart und die Keimbahntransmission des deletierten Allels durch Southern Blot Analyse getestet (Abbildung 2.2b). Um die *Evi5*-Defizienz auf RNA Ebene nachzuweisen, wurde für eine RT-PCR wt und *Evi5*^{-/-} RNA aus verschiedenen Geweben isoliert. Der für die RT-PCR verwendete 5' Primer bindet im ersten Exon und der 3'Primer im deletierten Bereich, so dass ein 300bp großes Fragment auf wt cDNA entsteht aber es zu

keiner Amplifikation auf cDNA von $Evi5^{-/-}$ Geweben kommt (Abbildung 2.2c). Eine Amplifikation auf genomischer DNA konnte ebenso ausgeschlossen werden, da die Primer einen Bereich von fast 50kb überspannen.

Für den Nachweis der $Evi5$ -Defizienz auf Proteinebene wurde ein Antikörper in Kaninchen hergestellt, der gegen die ersten 100 Aminosäuren des Proteins gerichtet war. Die erhaltenen Antikörperseren waren zwar in der Lage in Cos7-Zellen überexprimiertes, Flag markiertes $Evi5$ Protein zu erkennen, jedoch nicht das endogene Protein aus Geweben.

2.1.1 Auswirkungen der $Evi5$ -Defizienz in hämatopoetischen Zellen

Die homozygoten $Evi5^{-/-}$ Mäuse zeigten eine normale Entwicklung und keinen sofort ersichtlichen Phänotyp im Vergleich zu wt Mäusen. Zur genaueren Analyse der $Evi5^{-/-}$ Mäuse wurden Zellen aus dem Thymus, der Milz und dem Knochenmark von zwei unabhängigen Mauspaaren ($wt/Evi5^{-/-}$) mit unterschiedlichen Oberflächenmarkern gefärbt, um sowohl die T- und B-Zellentwicklung, als auch die hämatopoetischen Stammzellen, Monocyten und Granulocyten zu untersuchen. In Abbildung 2.3 sind die Ergebnisse der einzelnen FACS-Färbungen der B- und T-Zellen für ein $wt/Evi5^{-/-}$ Mauspaar dargestellt.

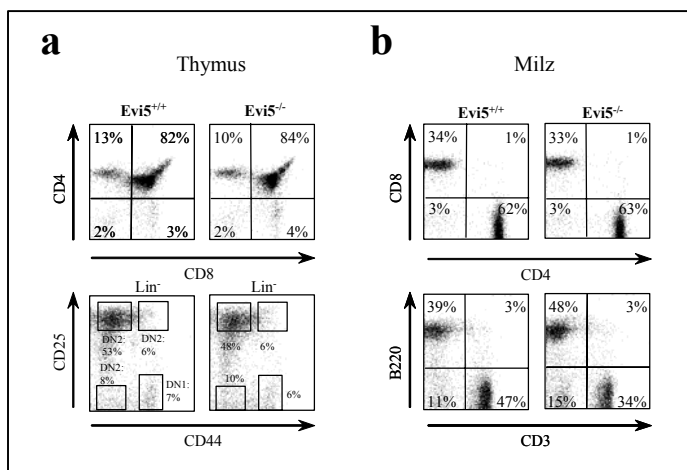


Abbildung 2.3: B- und T-Zellen in wt und $Evi5^{-/-}$ Mäusen

(a) Verteilung der $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellen im Thymus: $CD4/CD8$ Darstellung von wt und $Evi5^{-/-}$ Thymocyten und Analyse der einzelnen DN-Populationen im Thymus: $CD44/CD25$ Darstellung lin^{-} Thymocyten.

(b) Analyse der $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellen aus der Milz: $CD4/CD8$ Darstellung $CD3^{+}$ T-Zellen. Verteilung der B- und T-Zellen in der Milz: $CD3/B220$ Darstellung von Milzzellen aus wt und $Evi5^{-/-}$ Mäusen.

In fast keiner der durchgeführten FACS-Analysen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den wt und den $Evi5^{-/-}$ Mäusen. Eine Ausnahme stellte die relative B- und T-Zellmenge in der Milz dar (Abbildung 2.3b). Die $Evi5^{-/-}$ Mäuse besaßen 13% weniger T-Zellen und 10% mehr B-Zellen gegenüber der wt Kontrollmaus. Allerdings konnte dieser Unterschied in einer zweiten Messung eines unabhängigen $wt/Evi5^{-/-}$ Mauspaares nicht

bestätigt werden. Auch in den Analysen der hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark von wt und Evi5-defizienten Mäusen konnten keine Unterschiede hinsichtlich der verschiedenen, betrachteten Zellpopulationen gefunden werden (Abbildung 2.4).

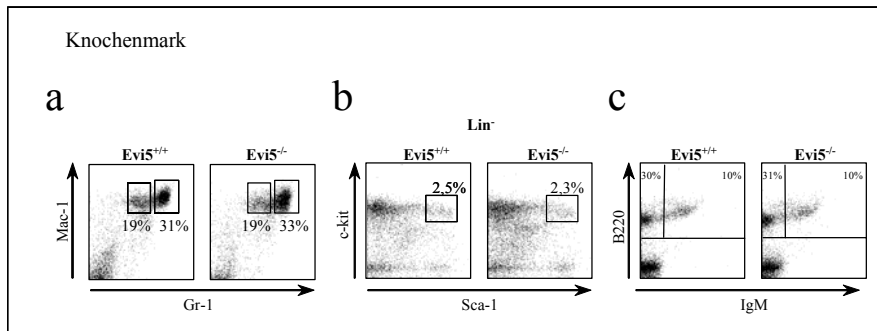


Abbildung 2.4: FACS-Analyse hämatopoetischer wt und Evi5^{-/-} Zellen aus dem Knochenmark

(a) Verteilung der Monocyten (Mac-1⁺Gr-1^{int}) und Granulocyten (Mac-1⁺Gr-1^{hi}) im Knochenmark von wt und Evi5^{-/-} Mäusen. (b) Analyse von pre- und pro-B-Zellen (B220⁺IgM⁻), unreifen B-Zellen (B220⁺IgM⁺). (c) Darstellung der hämatopoetischen Stammzellen aus wt und Evi5^{-/-} Mäusen. Sca-1/c-kit Färbung von lin⁻ Knochenmarkszellen.

Für die in Abbildung 2.3 und 2.4 gezeigten Analysen wurden jedoch Evi5^{-/-} Mäuse verwendet, die sowohl die Neomycin-Kassette, als auch einen sehr variablen genetischen Hintergrund aufwiesen, was unter anderem den relativ inkonsistenten Phänotyp der Zellverteilungen verursachen könnte. Daher wurden die Evi5^{-/-} Mäuse mit CMV-Cre Mäusen des C57Bl/6 Hintergrundes verpaart, um zum einen die Neomycin-Kassette zu entfernen und zum anderen einen „reineren“ C57Bl/6 Hintergrund zu erhalten. Weitere Analysen hämatopoetischer Zellen dieser Evi5^{-/-} Mäuse könnten eventuell einen Aufschluss darüber geben, ob Evi5 eine Rolle im hämatopoetischen System und dort besonders in den T-Zellen, spielt. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass die T-Zelltumore, die durch die Provirusinsertion in den Evi5 Locus entstanden sind, eine alleinige Folge der Gfi1 Überexpression waren. Hauptziel in der folgenden Promotionsarbeit war es daher die Rolle des Zinkfinger Transkriptionsfaktors Gfi1 in peripheren T-Zellpopulationen zu untersuchen.

2.2 Periphere T-Zellpopulationen in Gfi1-defizienten Mäusen

2.2.1 Verteilung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Für die Analyse der T-Zellen in Gfi1-defizienten Mäusen wurden die Zellen mit Antikörpern gegen den CD3 T-Zellrezeptor sowie gegen die Korezeptoren CD4 und CD8 gefärbt. Lymphocyten können durch ihre definierte Größe und Granularität, die über das Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) durchflusszytometrisch gemessen werden können, elektronisch ausgewählt werden (Abbildung 2.5a). Die so markierte Population, wurde nun auf die Expression des CD3 Rezeptors untersucht (Abbildung 2.5b). Alle CD3⁺ T-Zellen wurden wiederum elektronisch ausgewählt und auf CD4- und CD8 Expression hin untersucht (Abbildung 2.5c).

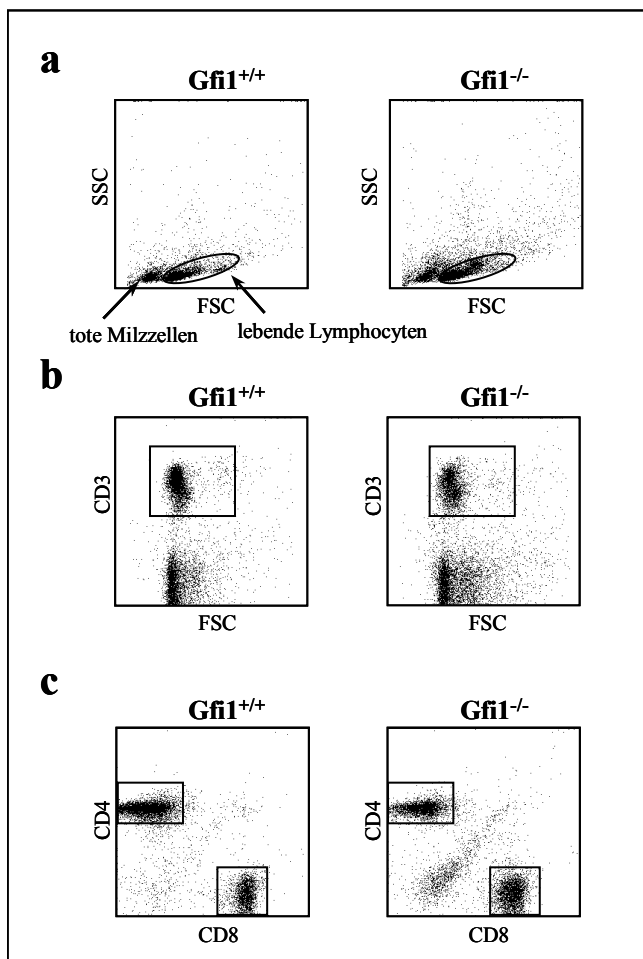


Abbildung 2.5: FACS-Analyse der CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Lymphocyten

Einzelzellsuspensionen von Milzzellen wurden mit Antikörpern gegen die unterschiedlichen Rezeptoren gefärbt und im Durchflusszytometer ausgewertet.

SSC: Seitwärtsstreulicht; FSC: Vorwärtsstreulicht

Die Gesamtzahl der Lymphocyten in der Milz war tendenziell in Gfi1-defizienten Mäusen geringer. Sie betrug im Durchschnitt $3,5 \times 10^7$ Zellen im Vergleich zu $5,5 \times 10^7$ Zellen in den wildtyp (wt) Mäusen, wobei dieser Unterschied mit einem p-Wert von 0,1 nicht statistisch signifikant war (Abbildung 2.6a). Dahingegen war die Anzahl an $CD3^+$, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in Milzen von Gfi1^{-/-} (Knock Out) Tieren deutlich niedriger, als in wt Mäusen (Abbildung 2.6b).

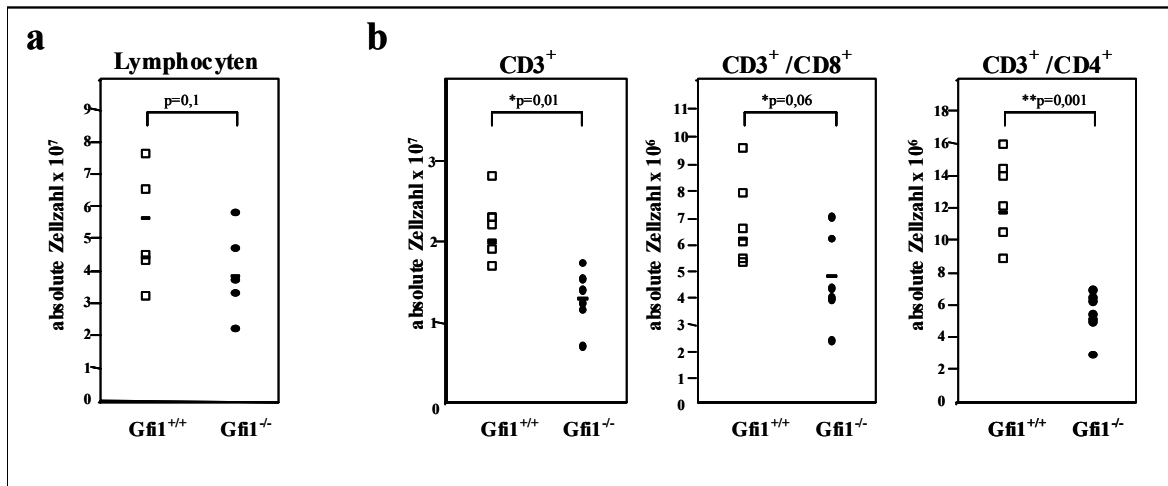


Abbildung 2.6: Gesamtzellzahlen verschiedener Lymphocyten Populationen in der Milz
Berechnung der absoluten Zellzahlen der Lymphocyten (a), der $CD3^+$, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen (b).

Betrachtet man die relative Häufigkeit der $CD3^+$ T-Zellen und die prozentuale Verteilung der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen innerhalb der $CD3^+$ T-Zellpopulation, so stellt man fest, dass prozentual in Gfi1^{-/-} Milzen weniger $CD4^+$ T-Zellen vorhanden waren, als es beim wt der Fall war. Allerdings war die relative Menge der $CD8^+$ T-Zellen signifikant erhöht (Abbildung 2.7a/b), so dass man in Gfi1-defizienten Tieren eine Verschiebung des % $CD4^+$ /% $CD8^+$ Verhältnisses (Gfi1^{+/+}: Gfi1^{-/-} = 2:1,4) zugunsten der $CD8^+$ Zellen fand (Abbildung 2.7c).

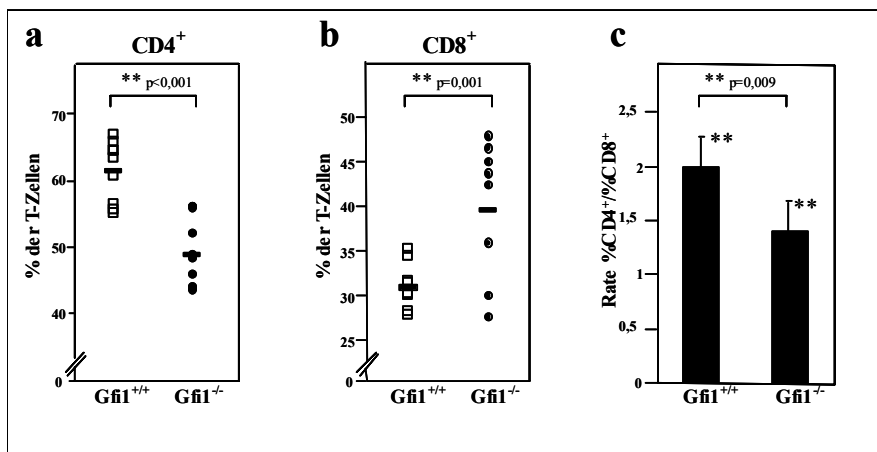


Abbildung 2.7: Prozentuale Anteile der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in der Milz
 $CD3^+$ T-Zellen wurden aufgrund ihrer $CD4^+$ und $CD8^+$ Korezeptor-Expression untersucht (a). Verhältnis der % $CD4^+$ /% $CD8^+$ T-Zellen (b).

2.2.2 $\gamma\delta$ T-Zellen in Gfi1-defizienten Mäusen

Über 95% der peripheren T-Zellen besitzen den $\alpha\beta$ T-Zellrezeptor. Nur ein geringer Anteil der T-Zellen trägt den $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor. Analysiert man die $CD3^+$ T-Zellen auf ihre CD4 und CD8 Korezeptor-Expression, so findet man in den $Gfi1^{-/-}$ Mäusen eine Ansammlung von $CD3^+CD4^-CD8^-$ T-Zellen, die in den wt Mäusen nicht vorhanden sind (Abbildung 2.5c; Abbildung 2.8a). Eine genauere Untersuchung dieser Zellen zeigte, dass es sich hierbei um $\gamma\delta$ T-Zellen handelte (Abbildung 2.8b), die negativ für den $\alpha\beta$ T-Zellrezeptor waren (Abbildung 2.8c). Die Analyse der Zellen zeigte, dass diese den IL-7R exprimierten, der normalerweise auf allen naiven T-Zellen zu finden ist (Abbildung 2.8d). Im Thymus von $Gfi1$ -defizienten Mäusen fand man eine zusätzliche Population an T-Zellen, die in wt Mäusen nicht vorhanden war. Diese Zellen trugen ebenfalls den $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor, den IL-7R und ähnelten ansonsten in der Expression der Oberflächenmarker sehr den $\gamma\delta$ T-Zellen aus der Milz (Abbildung 2.8e-h).

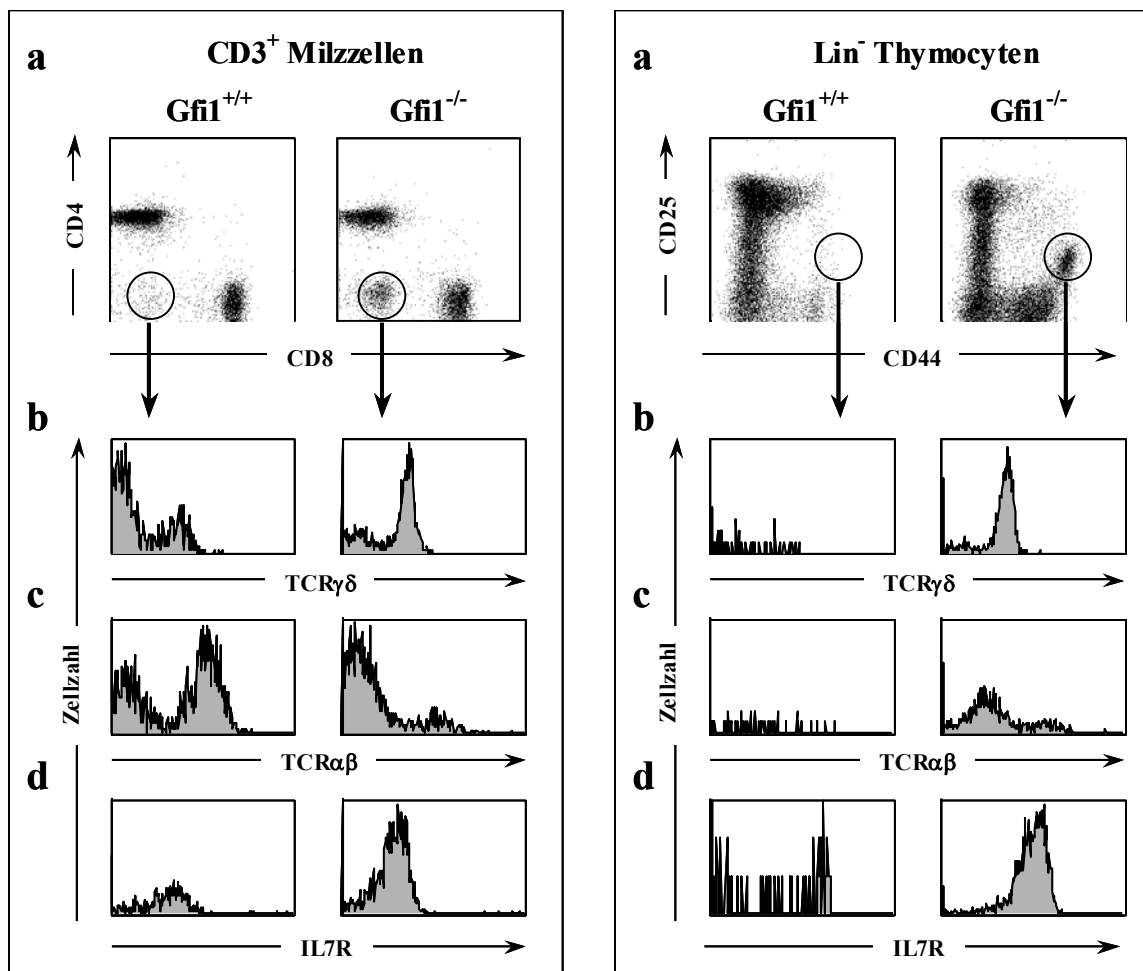


Abbildung 2.8: $\gamma\delta$ T-Zellen in der Milz und im Thymus

$CD3^+CD4^-CD8^-$ (a) T-Zellen wurden auf $\gamma\delta$ TCR (b) $\alpha\beta$ TCR (c) und IL-7R α (d) Expression untersucht. Die zusätzliche (mit einem Kreis markierte) Population im Thymus (e) wurde ebenfalls auf $\gamma\delta$ TCR (f) $\alpha\beta$ TCR (g) und IL-7R (e) Expression untersucht.

2.2.3 Gedächtnis T-Zellen in Gfi1-defizienten Mäusen

Die Gedächtnis T-Zellen können aufgrund der Expression bestimmter Oberflächenmarker von naiven T-Zellen unterschieden werden. Zum Beispiel wird CD44 in einer sehr geringen Menge auf ruhenden naiven T-Zellen exprimiert, wohingegen eine starke Expression auf Gedächtnis T-Zellen und Effektor T-Zellen zu finden ist. Die Gedächtnis T-Zellpopulation ist selber heterogen und kann bezüglich der Expression des „Homing“ Rezeptors L-Selektin (CD62L) in zentrale Gedächtnis T-Zellen und in Effektor Gedächtnis T-Zellen aufgeteilt werden. Die zentralen Gedächtnis T-Zellen zeigen einen $CD44^+CD62L^{hi}$ Phänotyp wohingegen Effektor Gedächtnis T-Zellen einen $CD44^+CD62L^{lo}$ Phänotyp aufweisen. $CD4^+$ (Abbildung 2.9a) und $CD8^+$ T-Zellen (Abbildung 2.9b) von wt und $Gfi1^{-/-}$ Mäusen wurden hinsichtlich der Gedächtnis T-Zellmarker Expression untersucht. Analysiert wurden T-Zellen aus der Milz und den zervikalen Lymphknoten.

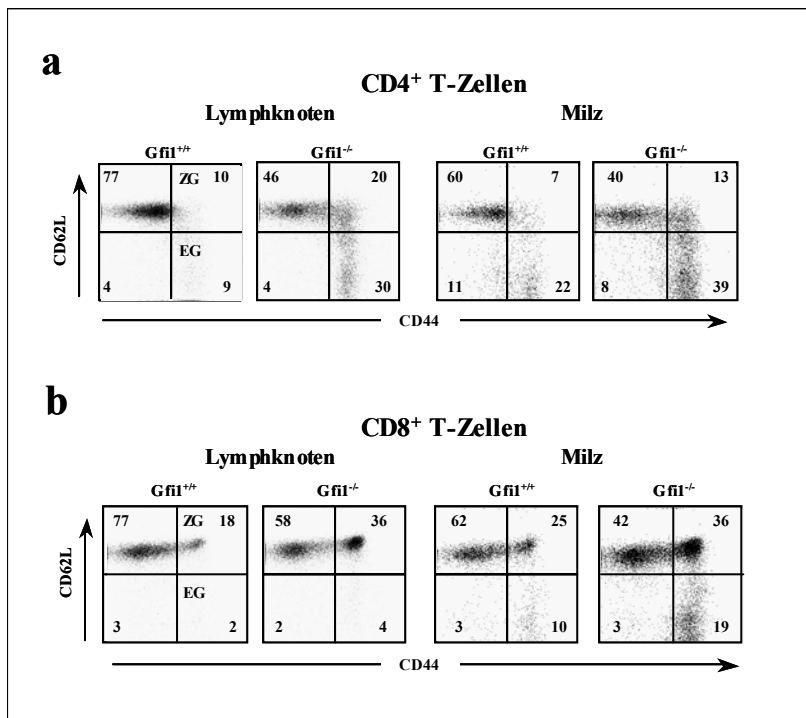


Abbildung 2.9: Gedächtnis T-Zellen in der Milz und in den zervikalen Lymphknoten

Lymphocyten wurden mit Antikörpern gegen CD4 (a) oder CD8 (b), CD44 und CD62L gefärbt und im FACS ausgewertet.

ZG: zentrale Gedächtnis T-Zellen;

EG: Effektor Gedächtnis T-Zellen

Sowohl innerhalb der $CD8^+$ T-Zellpopulation, als auch innerhalb der $CD4^+$ T-Zellpopulation waren Effektor und zentrale Gedächtnis T-Zellen in $Gfi1^{-/-}$ Mäusen prozentual gegenüber wt Mäusen angereichert (Abb.2.9). Am ausgeprägtesten war der Effekt bei den $CD4^+$ Effektor Gedächtniszellen in den zervikalen Lymphknoten. Hier betrug die durchschnittliche Anzahl an $CD4^+$ Effektor Gedächtniszellen 6% aller $CD4^+$ T-Zellen im wt und 18% im $Gfi1^{-/-}$ (Abbildung 2.10a).

In Abbildung 2.10 sind alle Befunde zu unterschiedlichen Gedächtnis T-Zellpopulationen in der Milz und in den zervikalen Lymphknoten der wt und der $Gfi1^{-/-}$ Mäuse als prozentuale Anteile der $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellen dargestellt.

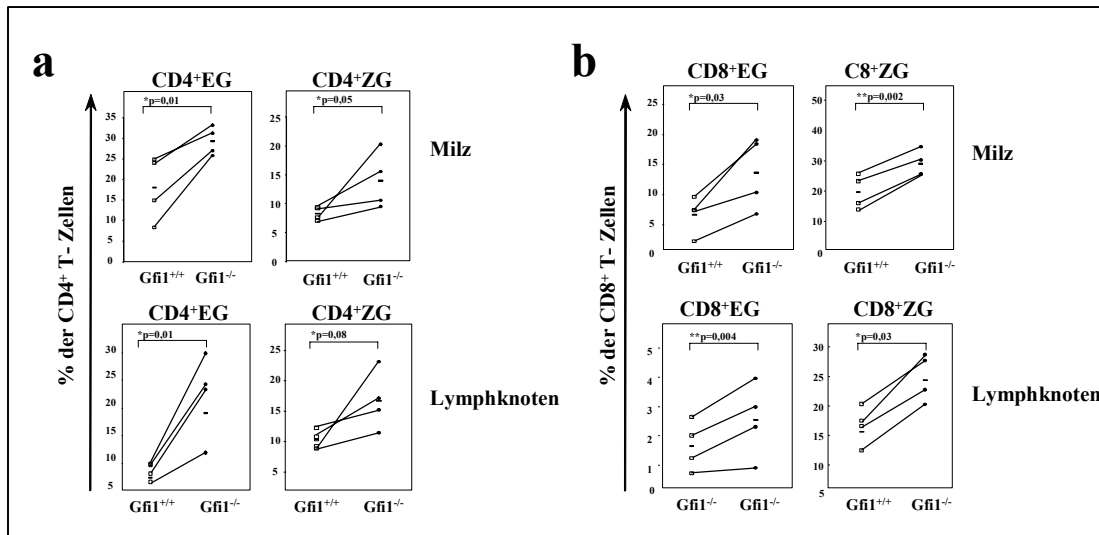


Abbildung 2.10: Prozentuale Anteile der Effektor und zentralen Gedächtnis T-Zellpopulationen
Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Gedächtnis T-Zellpopulationen von vier unabhängigen Mauspaaren ($Gfi1^{-/-}$ und $Gfi1^{+/+}$) aus zervikalen Lymphknoten und der Milz. (a) $CD4^{+}$ Gedächtnis T-Zellen (b) $CD8^{+}$ Gedächtnis T-Zellen. EG: Effektor Gedächtniszellen; ZG: zentrale Gedächtniszellen.

Für einzelne Milzen wurden zusätzlich die absoluten Zellzahlen der unterschiedlichen Gedächtnis T-Zellpopulationen bestimmt (Abbildung 2.11). Es waren insgesamt deutlich weniger $CD4^{+}$ Gedächtniszellen vorhanden (EG: $Gfi1^{-/-}$: $Gfi1^{+/+}$ = 13×10^5 : 23×10^5 und ZG: $Gfi1^{-/-}$: $Gfi1^{+/+}$ = 6×10^5 : 11×10^5). Die $CD8^{+}$ Effektor Gedächtniszellen befanden sich auf dem wt Niveau, wobei die Menge an $CD8^{+}$ zentralen $Gfi1^{-/-}$ Gedächtniszellen etwas geringer war, als in den wt Mäusen (ZG: $Gfi1^{-/-}$: $Gfi1^{+/+}$ = 11×10^5 : 14×10^5).

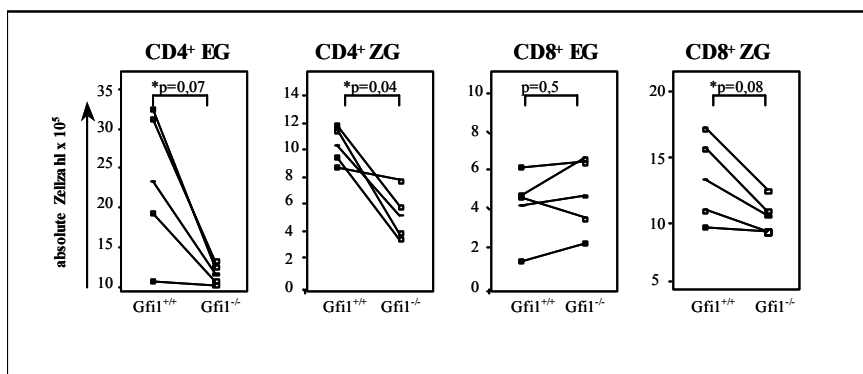


Abbildung 2.11: Gesamtzellzahlen der Gedächtnis T-Zellen

Berechnung der absoluten Zellzahlen der einzelnen Gedächtnis T-Zellpopulationen, bezogen auf eine Milz.

Um die Gedächtnis T-Zellpopulationen genauer zu analysieren, wurden die $CD4^+$ T-Zellen bezüglich der CD45Rb Expression, und die $CD8^+$ T-Zellen bezüglich der IL-2/IL-15R β -Ketten (CD122) Expression untersucht. Naive T-Zellen exprimieren den CD45Rb Marker auf ihrer Oberfläche. Werden die Zellen aktiviert und differenzieren zu Gedächtnis T-Zellen, regeln sie die Expression des Markers herab. So ist die Größe der $CD45Rb^{lo}/CD44^+$ Population ein Maß für die Anzahl der $CD4^+$ Gedächtnis T-Zellen. Die $CD45Rb^{lo}$ Population war in Gfi1-defizienten Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 2.12a).

Naive $CD8^+$ T-Zellen exprimieren eine geringe Menge des CD122 Markers auf ihrer Oberfläche. Erst nach ihrer Aktivierung und nach Eintritt in das Gedächtnis T-Zellstadium findet eine erhöhte Expression der IL-2/IL-15R β Kette statt. Die Anzahl der $CD122^+$ Zellen spiegelt so die relative Häufigkeit der $CD8^+$ Gedächtnis T-Zellen wieder. In den Gfi1 $^{-/-}$ Mäusen war die $CD122^+/CD44^+$ T-Zellpopulation deutlich erhöht (Abbildung 2.12b).

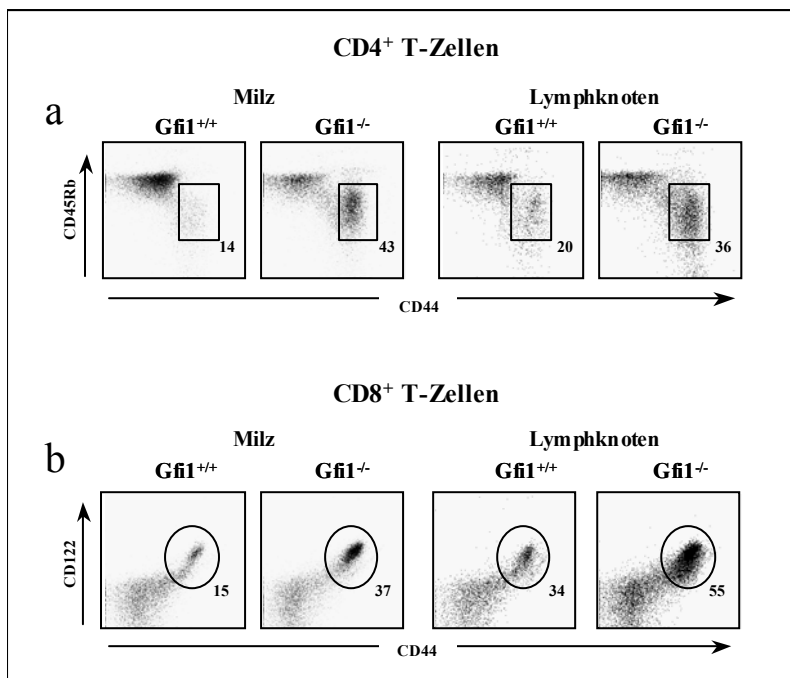


Abbildung 2.12: Expression von CD45Rb und CD122 auf Gedächtnis T-Zellen

$CD4^+$ T-Zellen aus der Milz oder den zervikalen Lymphknoten wurden mit Antikörpern gegen CD45Rb gefärbt (a) und $CD8^+$ T-Zellen, ebenfalls aus der Milz und den zervikalen Lymphknoten, mit Antikörpern gegen CD122 (b). Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch im FACS.

2.2.4 Apoptose in Gedächtnis T-Zellen

Um herauszufinden, ob die erhöhte Menge an Gedächtnis T-Zellen der $Gfi1^{-/-}$ Mäuse auf eine verminderte Apoptoserate innerhalb dieser T-Zellpopulationen zurückzuführen ist, wurden die apoptotischen Eigenschaften der einzelnen Gedächtnis T-Zellpopulation der wt und $Gfi1^{-/-}$ Mäuse durch AnnexinV Färbung untersucht. Ausschließlich Zellen, die das Apoptoseprogramm eingeleitet haben sind AnnexinV positiv. In der Abbildung 2.13 ist zu sehen, dass es keinen Unterschied in der AnnexinV Menge in den einzelnen Populationen der naiven und Gedächtnis T-Zellen gab.

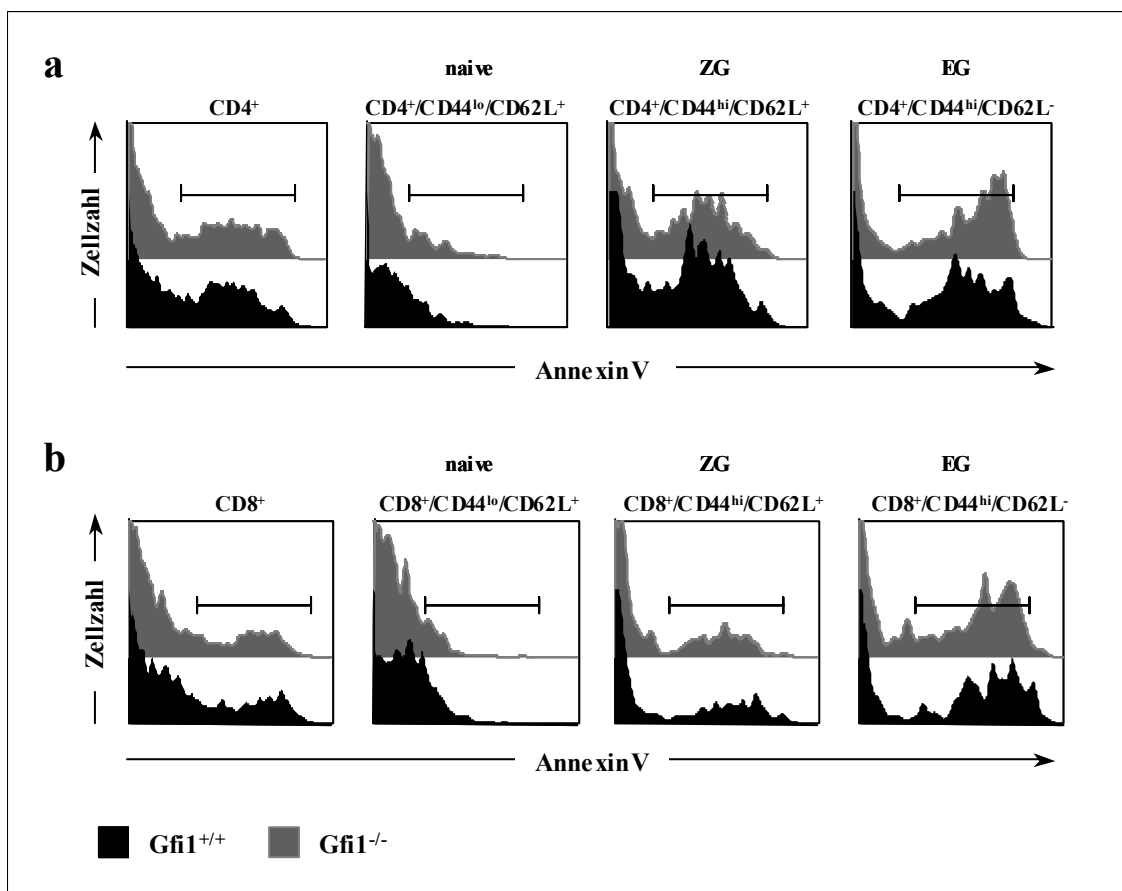


Abbildung 2.13: AnnexinV Färbung von Gedächtnis T-Zellen

Die einzelnen Subpopulationen der $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellen wurden mit AnnexinV gefärbt und im FACS ausgewertet. Naive T-Zellen: $CD4^{+}(CD8^{+})/CD44^{lo}CD62L^{+}$; zentrale Gedächtnis T-Zellen: $CD4^{+}(CD8^{+})/CD44^{hi}CD62L^{+}$; Effektor Gedächtnis T-Zellen: $CD4^{+}$ oder $CD8^{+} CD44^{hi}/CD62L^{-}$. Der Balken markiert die AnnexinV⁺, apoptotischen T-Zellen.

2.2.5 Doppelkreuzung der Gfi1-defizienten Mäuse mit „vav-Gfi1“ transgenen Mäusen

Um zu demonstrieren, dass die beobachteten Veränderungen der Gedächtnis T-Zellen in den Gfi1-defizienten Mäusen durch das Fehlen des Transkriptionsfaktors verursacht werden, wurden die Gfi1^{-/-} Mäuse mit „vav-Gfi1“ Transgenmäusen gekreuzt, um so das Gfi1 Protein unter der Kontrolle des vav-Promotors in hämatopoetischen Zellen wieder zu exprimieren. T-Zellen aus den zervikalen Lymphknoten und aus der Milz dieser doppelt transgenen Mäuse (Gfi1^{-/-}/vav-Gfi1) wurden auf die Expression der Gedächtnis T-Zellmarker CD45Rb (Abbildung 2.14b) und CD122 (Abbildung 2.14a) hin untersucht und mit der Expression in wt und Gfi1^{-/-} Mäusen verglichen. In der Milz Gfi1-defizienter Mäuse waren die Gedächtnis T-Zellpopulationen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gegenüber der wt Kontrolle erhöht. In den doppelt transgenen Mäusen war jedoch der prozentuale Anteil an Gedächtnis T-Zellen geringer und fast auf dem wt Niveau. Auch die Population der CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen der zervikalen Lymphknoten war in der Doppelkreuzung kleiner, als in Gfi1^{-/-} Mäusen. Eine Ausnahme bildeten die CD4⁺ Gedächtnis T-Zellen in den zervikalen Lymphknoten. Hier fanden sich in den doppelt transgenen Mäusen sogar noch etwas mehr Gedächtnis T-Zellen, als in den Gfi1^{-/-} Mäusen (Gfi1^{-/-}/vav-Gfi1: Gfi1^{-/-} = 54%:50%).

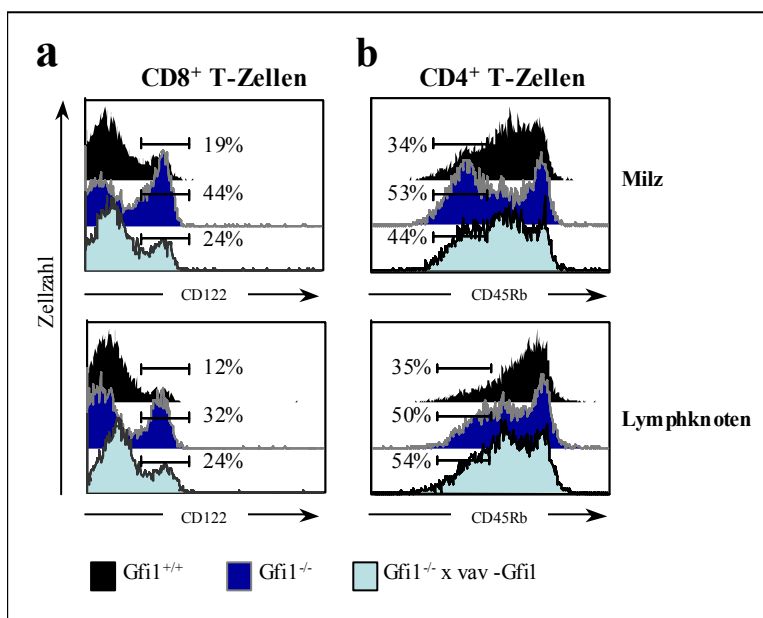


Abbildung 2.14: CD122 und CD45Rb Expression in Gfi1^{-/-}/„vav-Gfi1“ doppelt transgenen Mäusen

Die Expression von CD122 und CD45Rb wurde in doppelt transgenen und Gfi1^{-/-} Mäusen gemessen und mit der Expression in wt Mäusen verglichen.

2.2.6 IL-7 Rezeptor Expression auf naiven und Gedächtnis T-Zellen

Ein weiterer wichtiger T-Zellmarker ist der IL-7R (CD127). Er wird auf naiven und Gedächtnis T-Zellen exprimiert und wird nach Antigenstimulation herunter reguliert. Die Expression des IL-7 Rezeptors war auf CD8⁺ T-Zellen der Gfi1-defizienten Mäuse leicht erhöht und auf CD4⁺ T-Zellen unverändert gegenüber den wt Kontrollzellen (Abbildung 2.15). Wurden die T-Zellen mit α CD3+ α CD28 Antikörpern stimuliert, so nahm die IL-7 Rezeptor Expression auf der Oberfläche der wt und der Gfi1^{-/-} T-Zellen ab.

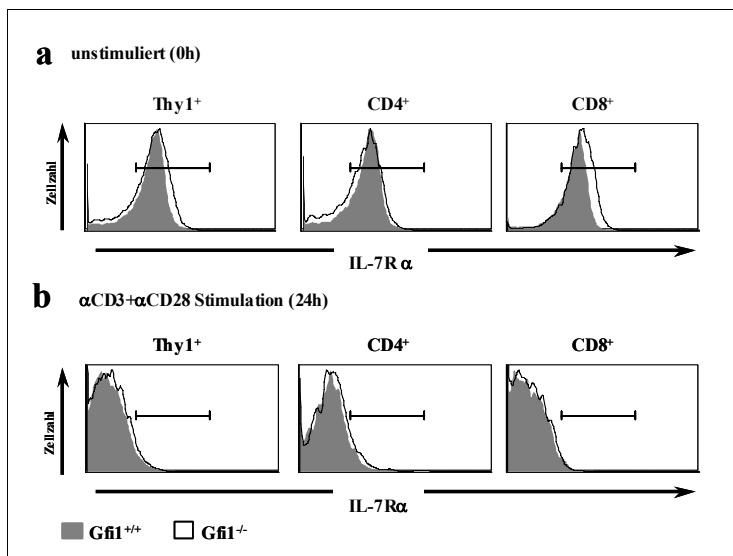


Abbildung 2.15: IL-7R α Expression auf naiven und aktivierten T-Zellen

Milzzellen wurden mit Antikörpern gegen Thy1.2, CD4, CD8 und IL-7R α gefärbt und im Durchflusszytometer ausgewertet (a). Es erfolgte eine Stimulation mit α CD3+ α CD28 Antikörpern für 24h. Anschließend wurden, wie unter (a) beschrieben, die T-Zellen gefärbt (b).

Betrachtet man allerdings die einzelnen naiven und Gedächtnis T-Zellpopulationen, so zeigte sich auch hier, in den Gfi1-defizienten Mäusen, eine leicht gesteigerte Expression des IL-7R auf den CD8⁺ T-Zellen, verglichen mit wt T-Zellen (Abbildung 2.16). Auffälliger war jedoch die geringere Menge an IL-7R⁺/CD4⁺ T-Zellen.

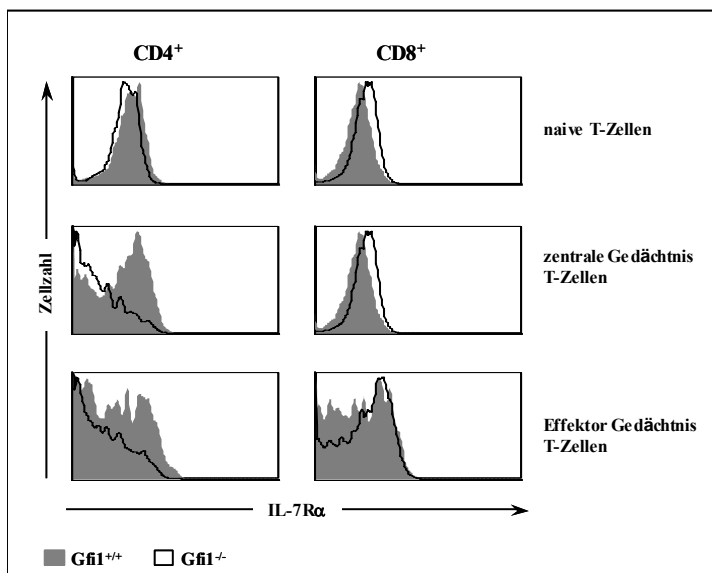


Abbildung 2.16: IL-7R α Expression in verschiedenen Gedächtnis T-Zell-Populationen

Sowohl CD4⁺, als auch CD8⁺ naive, zentrale und Effektor Gedächtnis T-Zellen wurden mit Antikörpern gegen die IL-7R α -Kette gefärbt.

2.3 Das Proliferationsverhalten von Gfi1-defizienten T-Zellen

2.3.1 Aktivierung von T-Zellen und die Progression im Zellzyklus

Nachdem die unterschiedlichen T-Zellpopulationen der peripheren lymphatischen Organe in den Gfi1-defizienten Mäusen analysiert worden waren, wurde nun die Funktionalität der T-Zellen in den Gfi1^{-/-} Mäusen untersucht. Funktionelle T-Zellen sind in der Lage, stimuliert zu werden und als Folge der TCR-Aktivierung zu proliferieren. Die T-Zellen aus wt und Gfi1-defizienten Mäusen wurden für die Analyse mit Antikörpern gegen den CD3 Rezeptor stimuliert. Nach zwei Tagen Stimulation konnten nur noch sehr wenig lebende T-Zellen innerhalb der Lymphocytenpopulation gefunden werden, wohingegen die wt T-Zellen zu proliferieren begannen (Abbildung 2.17b). Auch die zusätzliche Kostimulation mit α CD28 Antikörper, konnte das Sterben der Lymphocyten nach TCR-Stimulation nicht verhindern (Abbildung 2.17c). Wurden Milzzellen ohne Stimulation zwei Tage in Medium kultiviert, so war kein Unterschied im Verhalten der Gfi1^{-/-} Zellen im Vergleich zu wt Zellen zu erkennen (Abbildung 2.17a). Beide Populationen proliferierten nicht und es konnte kein Unterschied in Hinblick auf die Anzahl der lebenden Lymphocyten festgestellt werden.

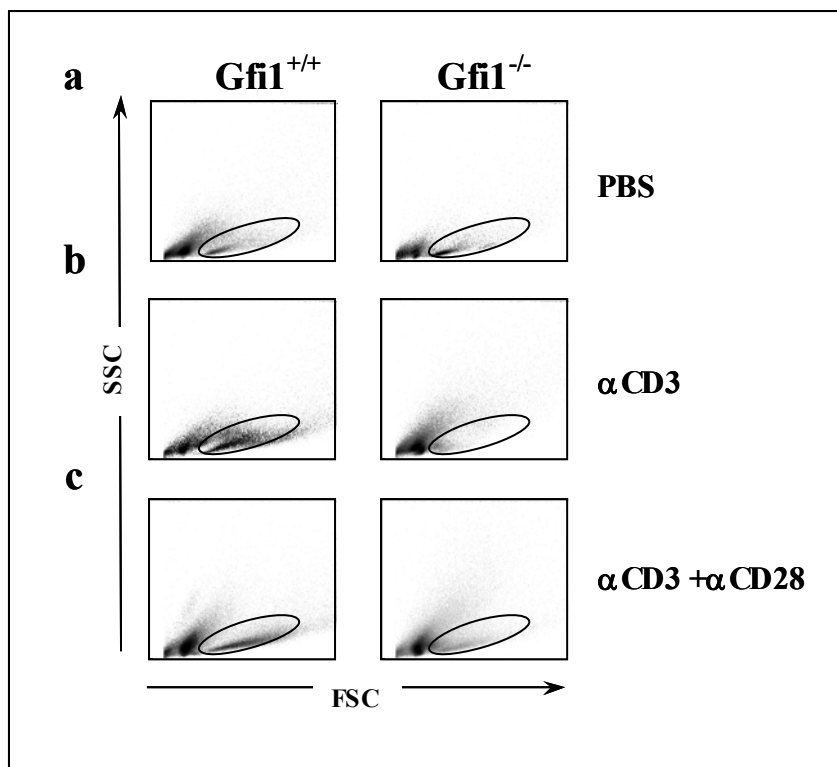


Abbildung 2.17: FSC/SSC Darstellung von wt und Gfi1-defizienten Lymphocyten nach TCR-Stimulation
Milzzellen wurden entweder mit PBS (a), mit α CD3 Antikörper (b) oder mit α CD3+ α CD28 Antikörper (c) stimuliert und durchflusszytometrisch ausgewertet.

Aufgrund dieser Befunde wurde die T-Zellantwort der $Gfi1^{-/-}$ T-Zellen genauer untersucht. Eine Möglichkeit, das Proliferationsverhalten von T-Zellen zu untersuchen, ist die Aktivierung der Zellen durch $\alpha CD3$ Antikörper und die anschließende Färbung dieser Zellen mit Propidium Iodid (PI) (siehe 5.7.4). Die Menge an interkalierendem PI, gibt den DNA-Gehalt der Zellen wieder. Je nach DNA-Menge können die Zellen so den verschiedenen Phasen des Zellzyklus zugeordnet werden. Jeweils 2×10^6 Milzzellen pro 48 Well wurden mit $\alpha CD3 + \alpha CD28$ Antikörpern stimuliert und nach ein, zwei oder drei Tagen Stimulation analysiert. Für die Auswertung wurden die Zellen mit dem T-Zell spezifischen Oberflächenmarker Thy1.2 gefärbt und anschließend die Intensität der PI Färbung innerhalb dieser T-Zellpopulation betrachtet (Abbildung 2.18).

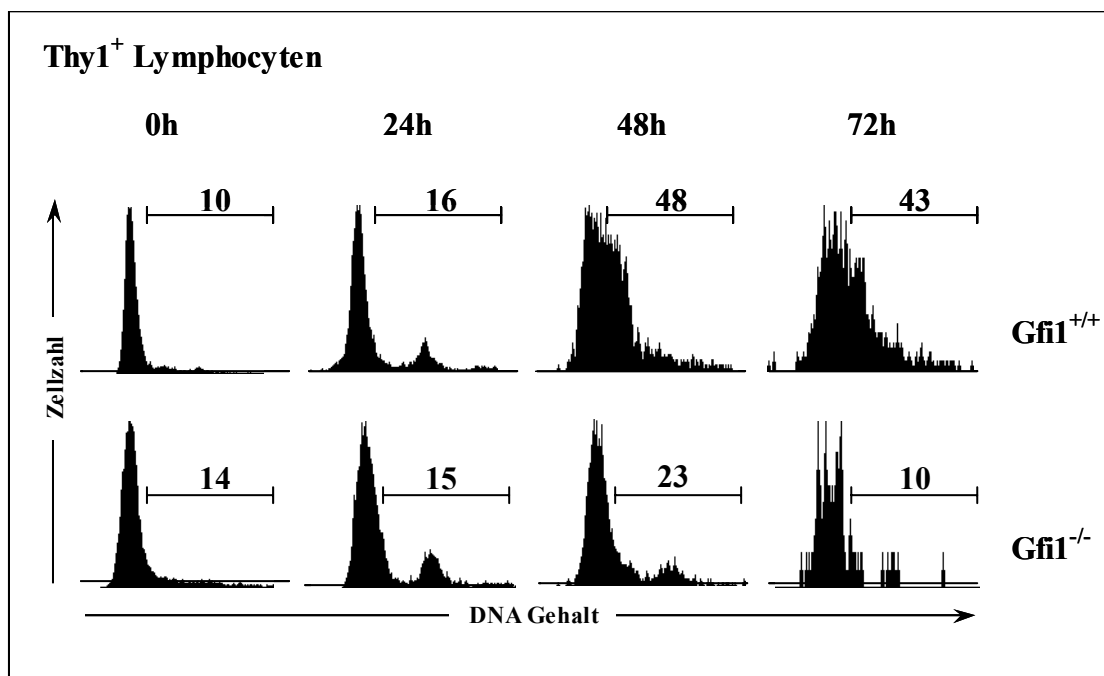


Abbildung 2.18: Propidium Iodid (PI) Färbung von Thy1.2⁺ Lymphocyten

Milzzellen wurden mit $\alpha CD3 + \alpha CD28$ Antikörpern stimuliert und nach verschiedenen Zeitpunkten mit PI gefärbt. Die Balken markieren die T-Zellen, die sich in der S/G₂/M-Phase des Zellzyklus befanden.

Betrachtet man die unstimulierten T-Zellen zum Zeitpunkt 0h, so fand sich der Hauptteil der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus. Zwischen $Gfi1^{-/-}$ und wt T-Zellen gab es keinen Unterschied hinsichtlich der Verteilung der Zellen innerhalb des Zellzyklus. Auch nach 24 Stunden Stimulation verhielten sich die $Gfi1^{-/-}$ T-Zellen wie die wt Kontrollzellen. Erst nach 48 Stunden Stimulation des T-Zellrezeptors war ein deutlicher Unterschied innerhalb der Zellzyklusprogression zu erkennen. 48% der wt Thy1.2⁺ T-Zellen, im Vergleich zu 23% der $Gfi1^{-/-}$ T-Zellen, waren in den Zellzyklus eingetreten und befanden sich in der S/G₂/M-Phase.

Nach 72 Stunden Stimulation war der Effekt noch deutlicher zu erkennen. Nur noch 10% der $Gfi1^{-/-}$ T-Zellen befanden sich in der S/G₂/M Phase gegenüber 43% im wt. Zusätzlich konnten nur noch sehr wenige lebende $Gfi1^{-/-}$ T-Zellen gemessen werden. Für eine genauere Analyse der Zellzyklusprogression wurde das Proliferationsverhalten der CD4⁺ der CD8⁺ T-Zellen separat untersucht. Auch hier konnten die zuvor gefundenen Unterschiede beim Eintritt in die S-Phase bestätigt werden. Zum 0 Stunden Zeitpunkt war noch kein Unterschied zwischen wt und $Gfi1$ -defizienten T-Zellen zu sehen, jedoch nach 24 Stunden waren viel weniger $Gfi1^{-/-}$ T-Zellen in der S/G₂/M Phase und nach 48 Stunden Stimulation war der Effekt noch deutlicher sehen (Abbildung 2.19).

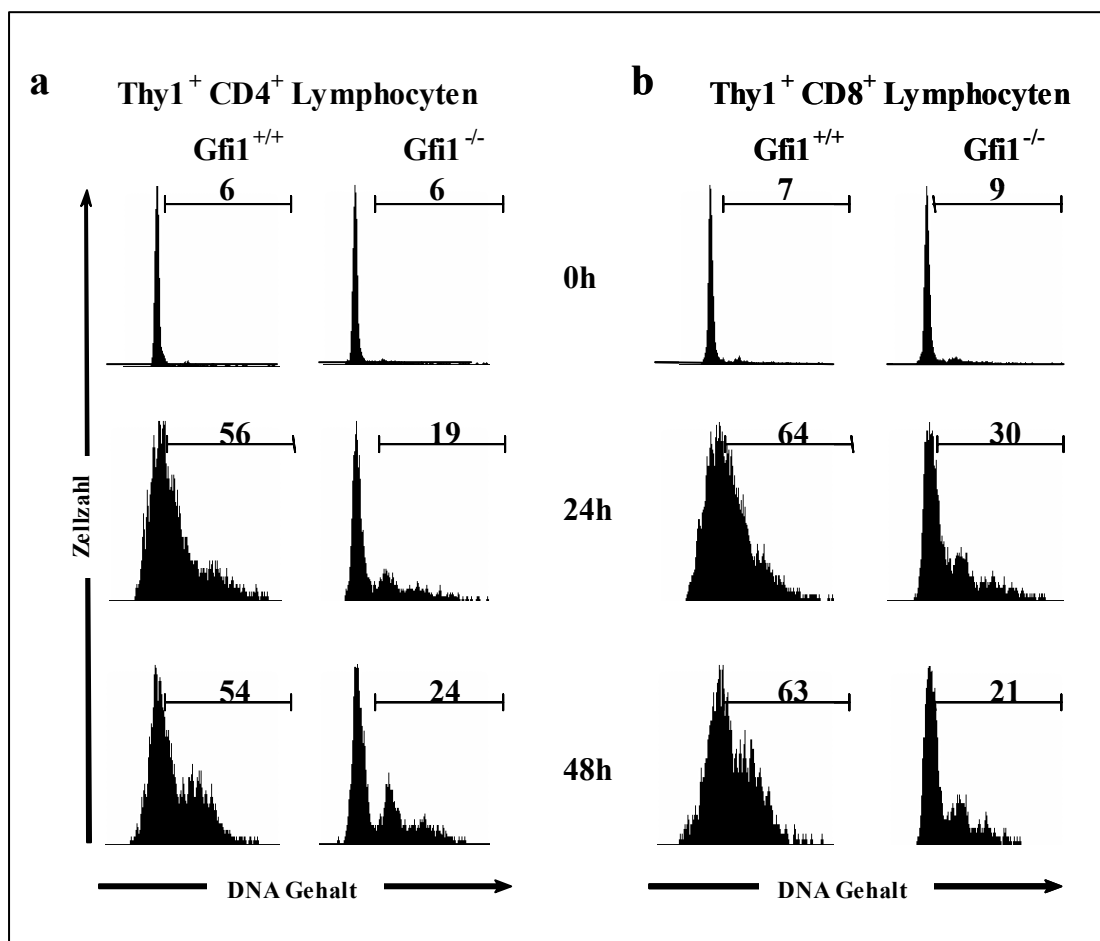


Abbildung 2.19: PI Färbung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphocyten

Milzzellen wurden mit Antikörpern gegen CD4 (a) und CD8 (b) gefärbt und nach verschiedenen Stimulationszeitpunkten wurde der DNA-Gehalt der T-Zellen durch PI-Färbung bestimmt.

2.3.2 Proliferationsverhalten der Gfi1^{-/-} T-Zellen

2.3.2.1 *In vitro* Proliferation

Um die Zellteilungsrate der Gfi1-defizienten T-Zellen zu untersuchen, wurde die CFSE Methode angewendet (siehe 5.7.5.1). Dabei wurden zum einen die gesamten Milzzellen mit CFSE angefärbt und zum anderen aufgereinigte, magnetisch sortierte T-Zellen gefärbt. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^6 pro Well für gereinigte T-Zellen bzw. 4×10^6 pro Well für gesamte Milzzellen auf 48er Lochplatten ausgesät und mit α CD3+ α CD28 Antikörpern stimuliert. Durch jede Zellteilung verteilt sich der CFSE-Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen, so dass jedes gemessene Maximum einer vollständigen Zellteilung entspricht. In Abbildung 2.20 ist die Verteilung der CFSE Fluoreszenz in Thy1⁺ T-Zellen zu sehen. Nach 24 Stunden war die Fluoreszenz stabil und das gemessene Maximum bildete den Ausgangspunkt der Messung. Nach 48 Stunden waren in wt T-Zellen die ersten zwei Teilungen zu sehen, während sich Gfi1^{-/-} T-Zellen noch nicht geteilt hatten. Nach 72 Stunden befanden sich nur noch sehr wenige T-Zellen innerhalb des Ursprungsmaximums, das bei 24 Stunden zu sehen war. Die meisten Zellen hatten sich ein bis viermal geteilt. In den Gfi1^{-/-} Milzzellen hingegen sind nur noch sehr wenig lebende T-Zellen vorhanden und eine Teilung ist nicht zu erkennen. Nach 96 Stunden haben sich alle wt T-Zellen geteilt, wobei der Hauptteil der Zellen vier Teilungen durchlaufen hat. Zu diesem Zeitpunkt konnten keine lebenden Gfi1^{-/-} T-Zellen mehr detektiert werden.

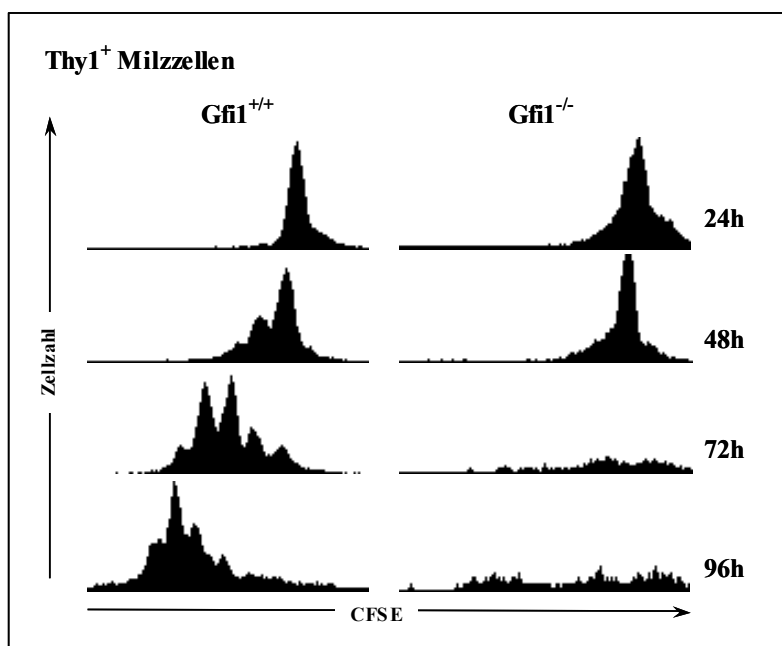


Abbildung 2.20: CFSE Färbung von Thy1.2⁺ Milzzellen

Bestimmung der Zellteilungsrate an verschiedenen Stimulationszeitpunkten.

Die sortierten, aufgereinigten T-Zellen wurden nach 24 Stunden für die Position des Ausgangsmaximums analysiert und nach 72 Stunden, um die Zellteilung der wt T-Zellen mit den Gfi1-defizienten T-Zellen zu vergleichen. Wt T-Zellen hatten sich ein bis fünfmal in dieser Zeit geteilt, im Gegensatz zu den Gfi1^{-/-} T-Zellen, die noch die ursprüngliche CFSE Fluoreszenz besaßen (Abbildung 2.21).

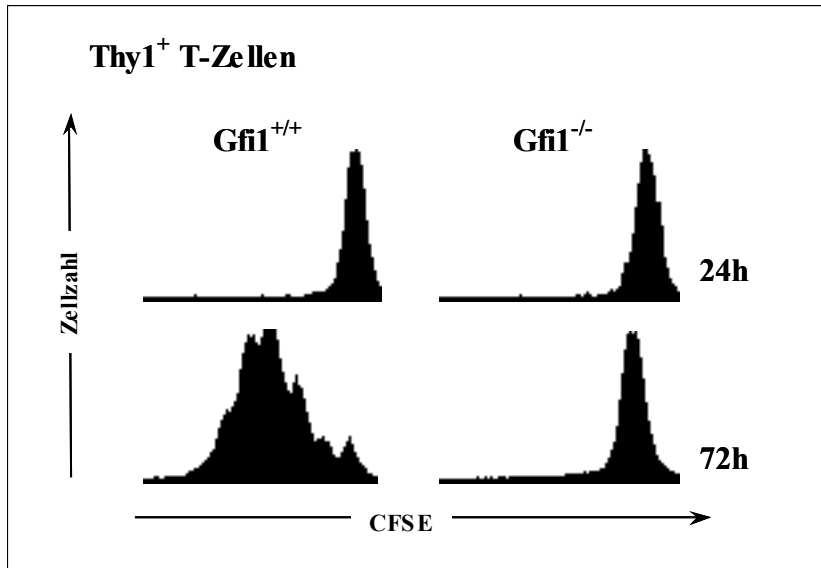


Abbildung 2.21: CFSE Färbung von sortierten Thy1.2⁺ T-Zellen

AutoMacs sortierte, CFSE gefärbte T-Zellen wurden drei Tage mit α CD3+ α CD28 Antikörpern stimuliert. Anschließend wurde im FACS die Zellteilungsrate bestimmt.

2.3.2.2 *In vivo* Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Um die gefundenen Ergebnisse der *in vitro* Proliferationsversuche zu bestätigen, wurden *in vivo* Stimulationsexperimente mit TCR restringierten OT-II und OT-I Mäusen durchgeführt, die entweder das wildtyp Gfi1 Allel trugen oder defizient für Gfi1 waren. Bei diesen Mäusen handelt es sich um TCR-transgene Mäuse, deren T-Zellen die umgeordneten α - und β -Ketten eines TCRs exprimieren, der spezifisch für ein bestimmtes Ovalbumin-Peptid ist (MHC-Klasse I: OT-I; MHC-Klasse II: OT-II). Die variablen Segmente der TCR-Ketten sind für beide Stämme gleich (V α 2, V β 5). Durch den Prozess, den man als „Allelic Exclusion“ bezeichnet, wird sichergestellt, dass jede T-Zelle nur einen erfolgreich rearrangierten T-Zellrezeptor exprimiert. Dadurch dass zum einen dieser Prozess nicht absolut ist und zum anderen nicht jede T-Zelle das TCR-Transgen in gleicher Stärke exprimiert, sind in den TCR transgenen OT-I und OT-II Mäusen auch T-Zellen vorhanden, die nicht den spezifischen Ova-TCR exprimieren. Um Ova spezifische T-Zellen zu analysieren, wurden diese mit α CD4 oder α CD8 und α V α 2 Antikörpern gefärbt.

Die im folgenden beschriebenen *in vivo* Stimulationsexperimente und Transplantationen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. R. Yücel und Petra Plessow (IFZ, Essen) durchgeführt. TCR OT-II/Gfi^{+/+} und TCR OT-II/Gfi^{-/-} T-Zellen wurden mit CFSE angefärbt und in C57Bl/6 Empfängermause transplantiert, die 24 Stunden zuvor mit dem spezifischen OT-II Peptid oder nur mit PBS, als Kontrolle injiziert worden waren (siehe 5.7.5.2; Abbildung 2.22). Nach drei Tagen wurden diesen Mäusen die Milzen entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Milzzellen wurden mit Fluoreszenz gekoppelten Antikörpern gegen Thy1.2, CD4 und Vα2 gefärbt und 1000 zuvor transplantierte, CFSE positive Zellen wurden elektronisch aufgenommen. Nur die transplantierten, CFSE positiven Zellen waren in der Lage auf das spezifische Peptid zu antworten und zu proliferieren.

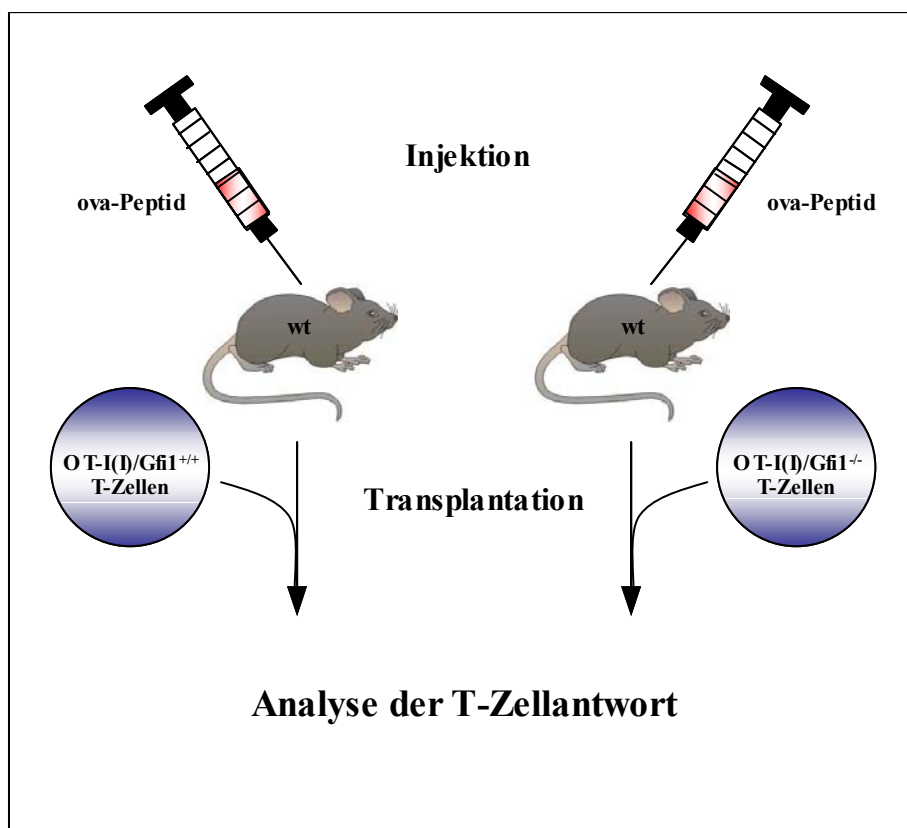


Abbildung 2.22: Schematische Darstellung des *in vivo* Proliferationsexperimentes

Mit CFSE gefärbte T-Zellen OT-I(I)/Gfi1^{+/+} oder OT-I(I)/Gfi1^{-/-} wurden in wt Empfängermause transplantiert, die 24h zuvor mit dem spezifischen Ova-Peptid (entweder OTI- oder OT-II-Peptid) injiziert wurden. Nach drei Tagen wurde die Proliferation der transplantierten T-Zellen untersucht.

Vergleicht man die wt TCR-transgenen T-Zellen mit den Gfi1^{-/-} transgenen Zellen (Abbildung 2.23), zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Proliferationsverhalten. Die wildtyp T-Zellen begannen zu proliferieren, wohingegen die CFSE Fluoreszenz der Gfi1^{-/-} T-Zellen nahezu unverändert blieb.

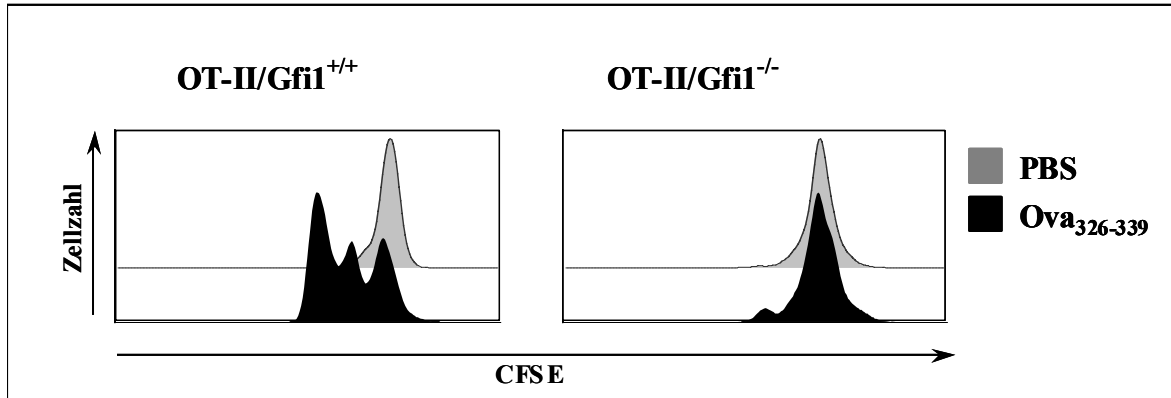


Abbildung 2.23: *In vivo* Proliferation von CD4⁺ T-Zellen

CFSE gefärbte OT-II/Gfi1^{-/-} T-Zellen wurden in OT-II-Peptid injizierte wt Mäuse transplantiert und nach drei Tagen im Durchflusszytometer ausgewertet.

Um die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden in diesem Fall TCR-transgene OT-I Mäuse verwendet, die ein Transgen für einen bestimmten T-Zellrezeptor des spezifischen OT-I-Peptids exprimieren. Auch hier wurden TCR OT-I/Gfi1^{+/+} und TCR OT-I/Gfi1^{-/-} T-Zellen mit CFSE gefärbt und anschließend in zuvor mit Peptid immunisierte C57Bl/6 Mäuse transplantiert. Nach drei Tagen erfolgte die Analyse analog zu den OT-II transgenen Zellen (2.3.2.2), nur dass in diesem Fall ein Antikörper gegen den CD8 Korezeptor verwendet wurde. Im Gegensatz zu den CD4⁺ T-Zellen waren die CD8⁺ T-Zellen aus Gfi1^{-/-} Mäusen in der Lage, auf das Antigen zu reagieren. Sie teilten sich mit derselben Rate wie wt T-Zellen (Abbildung 2.24).

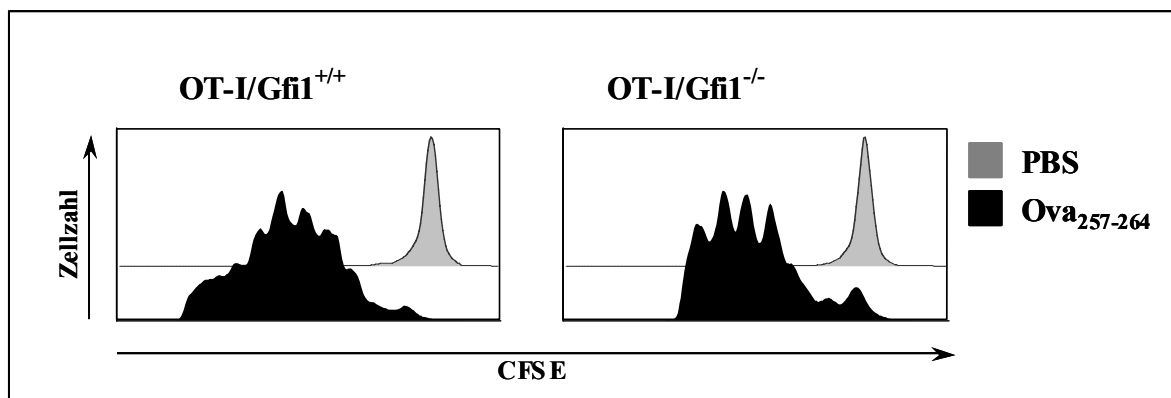


Abbildung 2.24: *In vivo* Proliferation von CD8⁺ T-Zellen

CFSE gefärbte OT-I/Gfi1^{-/-} T-Zellen wurden in zuvor mit Ova-Peptid injizierte wt Mäuse transplantiert und nach drei Tagen im Durchflusszytometer analysiert.

Ein weiterer *in vivo* Versuch, bei dem OT-II spezifisches Peptid in TCR OT-II/Gfi^{+/+} oder in TCR OT-II/Gfi^{-/-} injiziert wurde, zeigte ebenfalls, dass die Gfi1-defiziente T-Zellen im Vergleich zu wt T-Zellen einen Defekt in der Proliferationsantwort aufweisen. OT-II spezifische wt Zellen zeigten nach einer Woche Peptid-Stimulation fast alle eine hohe CD44 Expression und nur noch sehr wenige Zellen waren im naiven Zustand (3 %). Im Gegensatz dazu waren nach Peptidstimulation deutlich mehr naive Gfi1^{-/-} T-Zellen vorhanden (15,7 %) (Abbildung 2.25).

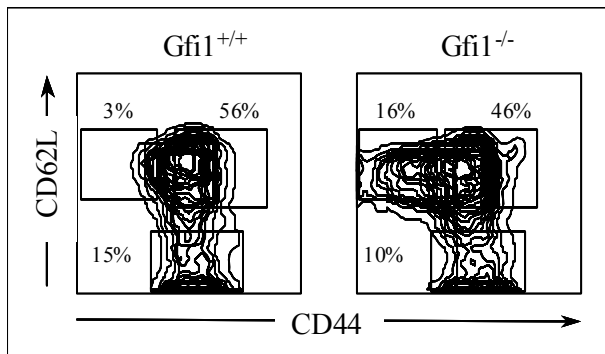


Abbildung 2.25: *In vivo* Peptid-Stimulation von OT-II transgenen Mäusen

OT-II/Gfi1^{+/+} oder OT-II/Gfi1^{-/-} Mäuse wurden mit OT-II-Peptid injiziert. Nach einer Woche wurden die relativen Anteile der naiven, zentralen und Effektor Gedächtnis T-Zellen, innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation, bestimmt.

2.4 Die Rolle des programmierten Zelltods in Gfi1^{-/-} T-Zellen

2.4.1 Aktivierungs-induzierter Zelltod (AICD) in peripheren T-Zellen

Die vorherigen Proliferationsexperimente der peripheren T-Zellen zeigten, dass Zellen aus Gfi1^{-/-} Mäusen, im Gegensatz zu wt T-Zellen nicht gut in Zellkultur überleben. Nach 48 Stunden TCR-Stimulation waren fast keine lebenden Gfi1-defizienten T-Zellen mehr nachweisbar. Daher wurde in den folgenden Experimenten das Verhalten der Gfi1^{-/-} T-Zellen gegenüber apoptotischen Stimuli untersucht und mit den wt Zellen verglichen. Zuerst wurden T-Zellen, analog zu den zuvor beschriebenen Proliferationsversuchen, mit α CD3+ α CD28 stimuliert und die Menge der lebenden T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Abbildung 2.26). Frisch isolierte T-Zellen aus wt und Gfi1^{-/-} Mäusen zeigten keinen Unterschied in der Menge der lebenden Zellen. Nach der Stimulation waren im Durchschnitt die Hälfte der wt Zellen aber fast alle Gfi1^{-/-} T-Zellen abgestorben.

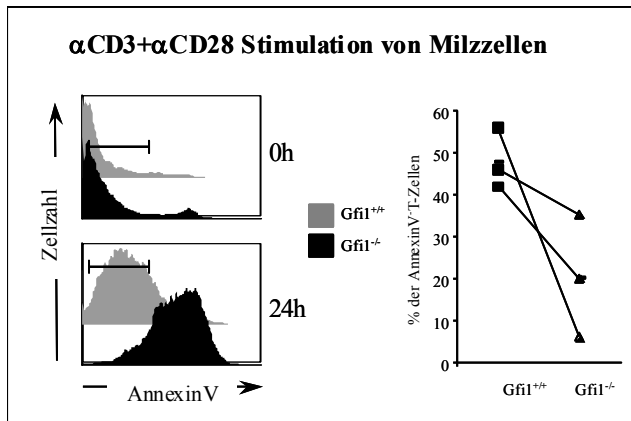


Abbildung 2.26: AnnexinV Färbung von stimulierten Milzzellen

Lymphocyten aus der Milz wurden mit Thy1.2 Antikörper und mit AnnexinV gefärbt. Gemessen wurden die lebenden Zellen, (AnnexinV negative Fraktion) nach 0h und nach 24h TCR-Stimulation. Die Balken markieren lebende (AnnexinV⁻) T-Zellen.

Für den aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) wurden Milzzellen aus Gfi1^{-/-} und wt Mäusen isoliert und mit α CD3 Antikörper + IL-2 für 24 Stunden prästimuliert, um so die Zellen für die Apoptose zu sensibilisieren (siehe 5.7.3). Anschließend wurden die Zellen zum zweiten mal mit weiterem α CD3 Antikörper oder nur mit PBS für 12 Stunden restimuliert. Für die Analyse der Zellen im FACS, wurden diese mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Thy1.2/CD4/CD8 und AnnexinV gefärbt. Apoptotische Zellen exponieren Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche, welches durch AnnexinV gebunden werden kann und sind somit von lebenden Zellen zu unterscheiden. Werden die T-Zellen zuerst mit α CD3 Antikörper stimuliert und erhalten dann nach 24 Stunden eine zweite Stimulation des T-Zellrezeptors durch α CD3 Antikörper, leiten einige T-Zellen das Apoptoseprogramm ein. Vergleicht man die relativen Anteile der AnnexinV negativen (lebenden) T-Zellen in wt und Gfi1^{-/-} Mäusen miteinander (Abbildung 2.27), so stellte man fest, dass weniger Gfi1^{-/-} T-Zellen (Mittelwerte: Gfi1^{+/+}:Gfi1^{-/-} = 42%:22 %) noch vital waren, als wt T-Zellen. Allerdings zeigte die Analyse der T-Zellen, die nur mit PBS restimuliert worden sind, dass die 24-stündige Prästimulation mit α CD3 Antikörper ausreichend war, das Apoptoseprogramm in den Gfi1^{-/-} T-Zellen einzuleiten. Nur noch durchschnittlich 18% der T-Zellen waren AnnexinV negativ im Vergleich zu 55% der wt T-Zellen.

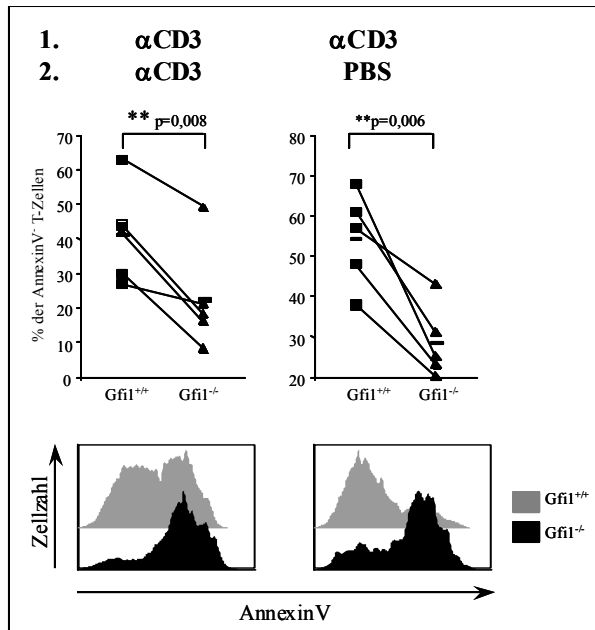


Abbildung 2.27: CD3 induzierte Apoptose in T-Lymphocyten

Lymphocyten aus der Milz wurden für 24 Stunden mit α CD3 Antikörper prästimuliert (1.) und anschließend erfolgte eine Restimulation ebenfalls mit α CD3 Antikörper für weitere 12 Stunden (2.). Durch AnnexinV Färbung wurden die Anteile an lebenden und toten Zellen in Gfi1^{-/-} Mäusen und wt Mäusen bestimmt. Oben: Darstellung der prozentualen Anteile der AnnexinV⁺ T-Zellen von 5 unabhängigen Mauspaaren (Gfi1^{-/-} und Gfi1^{+/+}). Unten: Exemplarische Darstellung einer AnnexinV Färbung von Gfi1^{-/-} und wt T-Zellen.

Aufgrund der Prästimulation des T-Zellrezeptors durch den α CD3 Antikörper kommt es zu einer gesteigerten Expression des CD95-Rezeptors (FasR) auf der Oberfläche der Zellen. Eine zweite Stimulation des CD95-Rezeptors, durch α CD95 Antikörper, löst in diesen Zellen den programmierten Zelltod aus. Die Gfi1^{-/-} T-Zellen besaßen schon im unstimulierten Zustand eine höhere CD95 Expression auf ihrer Oberfläche (Abbildung 2.28a).

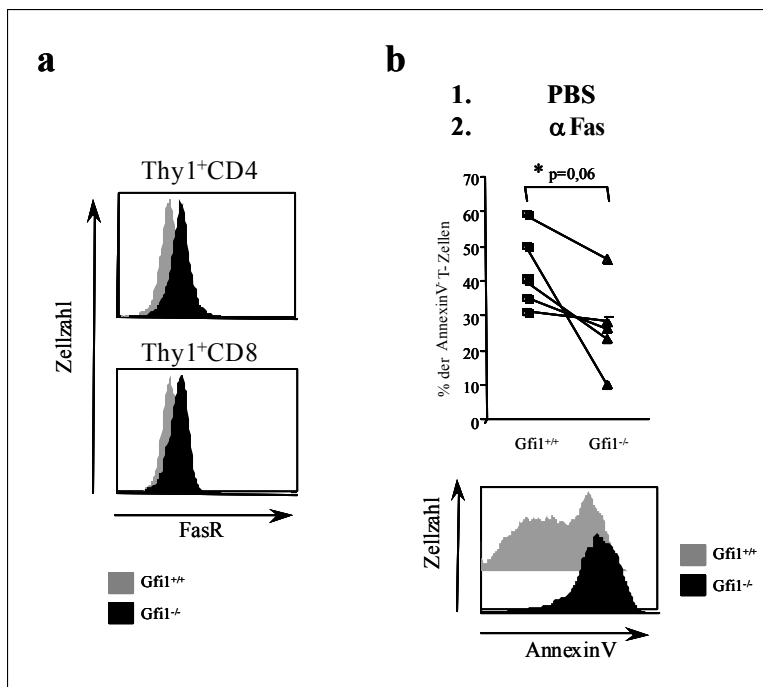


Abbildung 2.28: CD95 induzierte Apoptose in T-Lymphocyten

Frisch isolierte Milzzellen wurden mit Thy1.2/CD4/CD8/CD95 gefärbt und im Durchflusszytometer ausgewertet (a). Lymphocyten aus der Milz wurden für 24 Stunden mit PBS prästimuliert (1.). Anschließend erfolgte eine zweite Stimulation mit α CD95 Antikörpern für weitere 12 Stunden (2.). Durch AnnexinV Färbung wurden die Anteile an lebenden und apoptotischen Zellen im Gfi1^{-/-} und wt bestimmt (b).

Es war daher von Interesse zu untersuchen, wie sich die KO T-Zellen nach einer CD95-Stimulation verhalten. Bei wt Zellen fand man nach einer 12-stündigen CD95-Stimulation im Durchschnitt 41% Thy1.2⁺/AnnexinV⁺ T-Zellen und bei Gfi1^{-/-} T-Zellen waren es 31 % (Abbildung 2.28b). Die Gfi1^{-/-} T-Zellen leiteten also schneller das Apoptoseprogramm ein. Da

in den T-Zellen schon durch die alleinige TCR-Stimulation der Zelltod eingeleitet wurde, konnte die CD95 induzierte Apoptose nicht genauer untersucht werden. Die Prästimulation sollte hierfür mindestens zwei Tage betragen, bevor die zweite Stimulation mit α CD95 Antikörper erfolgt.

2.5 Analyse putativer Zielgene von Gfi1 mit Hilfe des DNA-Arrays

2.5.1 Biologische Prozesse in wt und Gfi1^{-/-} T-Zellen nach TCR-Stimulation

Um zu untersuchen, welche Konsequenzen ein Wegfall des Transkriptionsfaktors Gfi1 während der Aktivierung von T-Zellen auf genomischer Ebene spielt, wurde das Genexpressionsprofil von wt und Gfi1^{-/-} T-Zellen während der ersten Stunden der TCR-Aktivierung analysiert. Dazu wurden die T-Zellen zuerst aufgereinigt, jeweils 1×10^6 T-Zellen für 4, 8 und 24 Stunden mit α CD3+ α CD28 Antikörpern stimuliert und anschließend RNA isoliert. Die verschiedenen RNA-Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden für eine Hybridisierung auf DNA-Arrays verwendet (Affymetrix). Die Verarbeitung der RNA und die Herstellung der DNA-Arrays wurden von Adriane Parchatka und Dr. L. Klein-Hitpass durchgeführt, ebenso die Selektion der Expressionsdaten durch bestimmte Standard-Filterbedingungen. Durch die verschiedenen, angelegten Filter wurde sichergestellt, dass nur verlässlich gemessene Expressionsveränderungen betrachtet wurden. Einer der Filter beinhaltete die Bedingung, dass während jedes gemessenen Zeitpunktes eines der Gene, entweder im wt oder im Gfi1^{-/-}, als „anwesend“ (present call) detektiert werden musste, um bei der Ermittlung der differentiell exprimierten Gene berücksichtigt zu werden. Eine weitere Bedingung für eine veränderte Expression eines bestimmten Gens war die Signal-log/Rate eines Expressionswertes, die größer als 1,32 sein sollte. Dies bedeutete, die gemessene Expressionserhöhung (fold induction) sollte höher als $2^{1,32} = 2,5$ sein. Eine negative Signal-log/Rate bedeutete hierbei eine niedrigere Expression in den Gfi1^{-/-} T-Zellen gegenüber dem gemessenen Expressionswert im wt und eine positive Signal-log/Rate eine stärkere Expression. Insgesamt wurden über 3000 Gene gefunden, die mindestens zu einem gemessenen Zeitpunkt eine signifikante Abweichung in der Expressionsstärke in wt und Gfi1-

defizienten T-Zellen zeigten. Um diese Gene näher zu analysieren, wurden sie mit Hilfe des GO-Browsers der „Spotfire“ Software ausgewertet. Abbildung 2.29 zeigt einen Verzeichnisbaum, in dem für 2394 Gene, die unterschiedlich in $Gfi1^{-/-}$ T-Zellen gegenüber wt Kontrollzellen reguliert waren, eine Zuordnung in bestimmte biologische Prozesse erfolgt. Insgesamt findet das „Spotfire“ Programm auf den verwendeten Arrays 16372 annotierte Probenansätze, was bedeutet, dass für diese Gene ein biologischer Prozess bekannt ist, dem die entsprechenden Gene zugehörig sind. Mit Hilfe dieser Analyse Software war eine statistische Auswertung der regulierten Gene möglich. Es wurde jeweils die Anzahl der unterschiedlich regulierten Gene innerhalb eines bekannten biologischen Prozesses, in Relation zu den insgesamt vorhandenen Genen des Arrays, gesetzt. Der gemessene p-Wert gibt die Signifikanz für die relative Anreicherung von Genen, die für einen bestimmten biologischen Prozess relevant sind, wieder, wobei hier nur Prozesse als signifikant angereichert angesehen wurden, die einen p-Wert $<0,001$ aufwiesen.

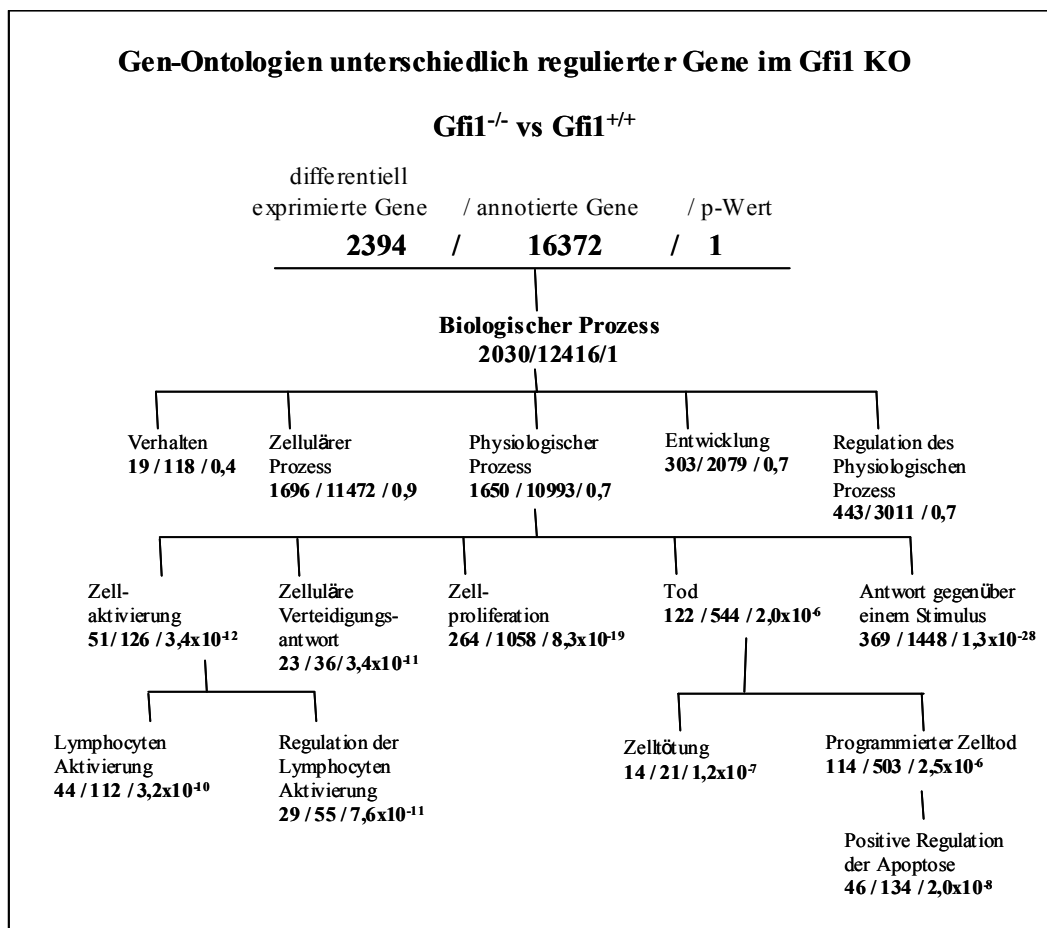


Abbildung 2.29: Verzeichnisbaum der unterschiedlich regulierten Gene in den $Gfi1^{-/-}$ T-Zellen gegenüber wt T-Zellen und deren Zuordnung in bestimmte biologische Prozesse (ausgewertet mit „Spotfire“)

Deutlich angereichert in der Liste der differentiell exprimierten Gene zwischen wt und Gfi1^{-/-} T-Zellen waren die Gene, die dem Prozess „Zellaktivierung“ und hierbei besonders Gene der „Lymphocyten Aktivierung“ und der „Regulation der Lymphocyten Aktivierung“ zugeordnet wurden. Weiterhin waren Gene der Prozesse „Zelluläre Verteidigungsantwort“, „Zellproliferation“, „Zelltod“ und der „Antwort auf Stimulus“ überrepräsentiert. Innerhalb des Prozesses „Zelltod“ fanden sich in dieser Analyse vermehrt Gene der „Zelltötung“ und des „Programmierten Zelltods“.

2.5.2 Gene der positiven Regulation der Apoptose

Innerhalb des Prozesses des programmierten Zelltods fand sich eine signifikante Anreicherung solcher Gene, die der positiven Regulation der Apoptose zugehörig waren (Abbildung 2.29). Der Hauptanteil der Gene, die hier betrachtet wurden, waren in Gfi1^{-/-} T-Zellen nach Stimulation hochreguliert (Abbildung 2.30) und wiesen positive Signal-log/Raten auf.

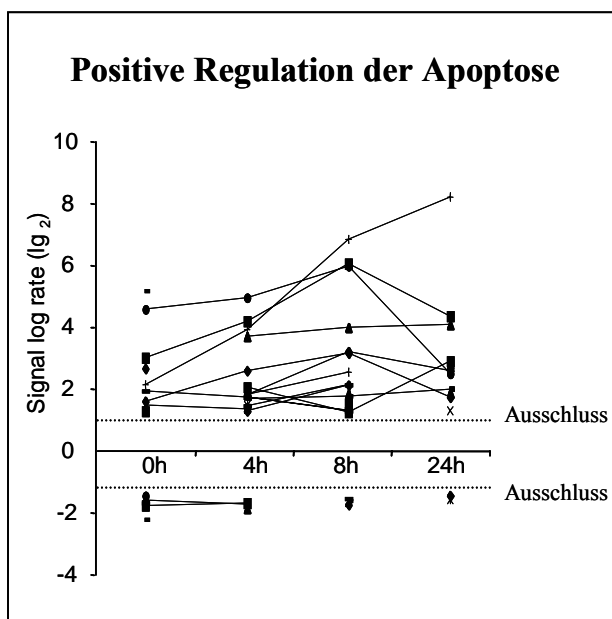


Abbildung 2.30: Positive Regulation der Apoptose
Signal-log/Raten der unterschiedlich regulierten Gene in den Gfi1^{-/-} T-Zellen, die dem Prozess der positiven Regulation der Apoptose zugehörig sind. Die Ausschlussgrenze entspricht einer Signal-log/Rate von +1,32 bzw. -1,32.

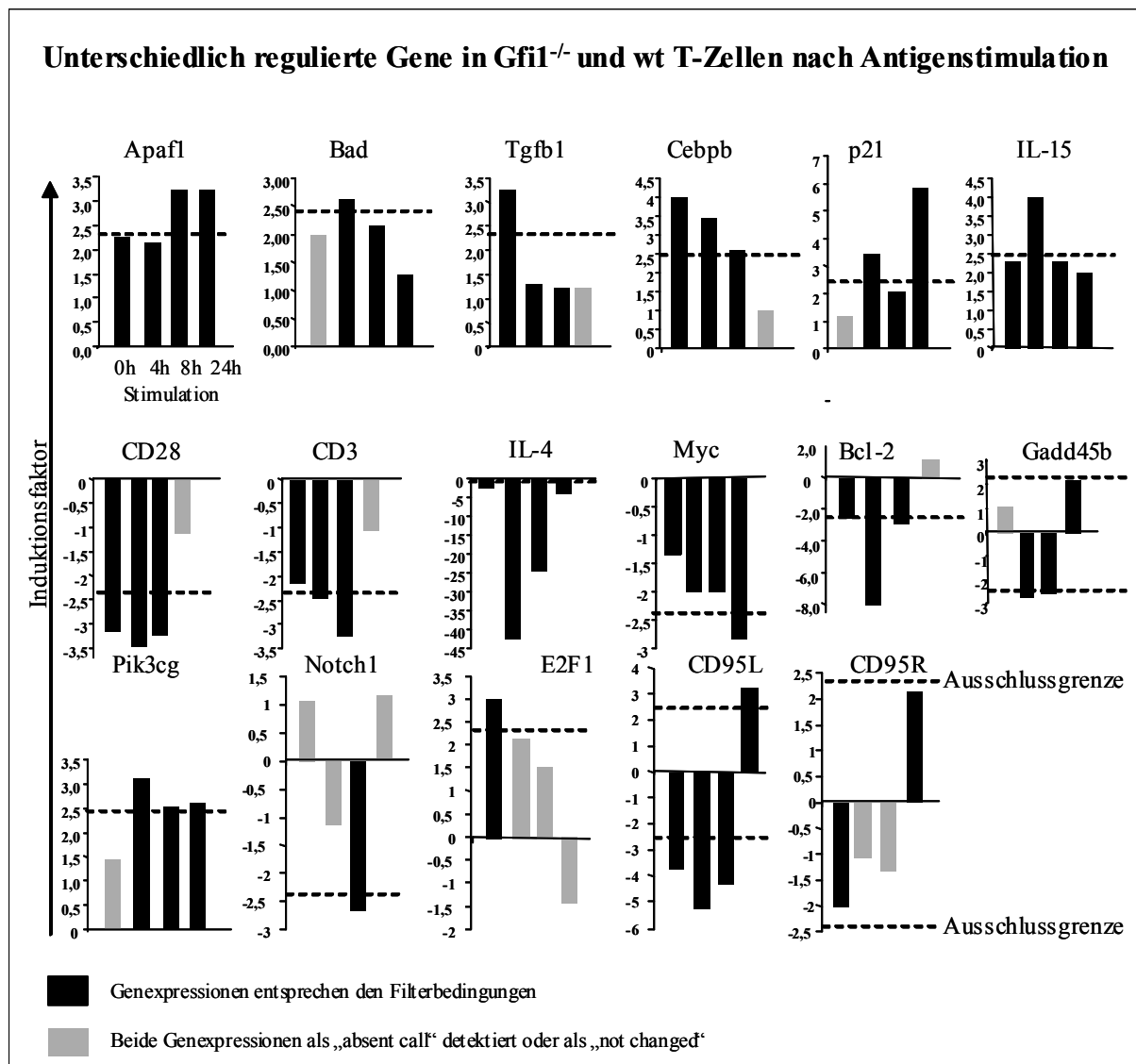


Abbildung 2.32: Expressionsunterschiede einzelner Gene der Lymphocytenaktivierung und der Apoptose in Gfi1^{-/-} und wt T-Zellen

Aus den Prozessen der Lymphocytenaktivierung und der Apoptose wurden 17 Gene ausgewählt und deren Expressionsverläufe über die vier Zeitpunkte dargestellt.

Um Gfi1 abhängige Expressionsunterschiede der ausgewählten Gene genauer zu betrachten, wurden Zeitkurven erstellt, die zu jedem Stimulationszeitpunkt den Expressionswert jedes einzelnen Gens wiedergeben (Abbildung 2.33). Anhand dieser Darstellung ist es möglich die unterschiedlichen Expressionsverläufe der Gene in Gfi1^{-/-} T-Zellen mit den Verläufen der Genexpressionen in wt Kontrollzellen zu vergleichen. Hierbei zeigte sich, dass die Gene Apaf1, Cebpb, IL-15, CD28, Myc und Pik3cg prinzipiell in Gfi1^{-/-} und wt T-Zellen während der Stimulation eine ähnliche Kinetik ihrer Expression aufweisen. Dabei zeigten Gfi1^{-/-} T-Zellen für die Gene Apaf1, Cebpb, IL-15 und Pik3cg ein generell erhöhtes Expressionsniveau und für die Gene Myc und CD28 ein generell erniedrigtes Expressionsniveau. Die Gene Bad, Tgfb1, p21, CD3, IL-4, Gadd45b, CD95L und CD95 hatten in Gfi1^{-/-} und wt T-Zellen größtenteils einen parallelen Expressionsverlauf. Die restlichen beiden Gene, Bcl-2 und Notch1, zeigten in wt und Gfi1^{-/-} T-Zellen vollkommen unterschiedliche Genexpressionsverläufe. Allerdings konnten nicht alle Gene zu jedem Zeitpunkt verlässlich im DNA-Array gemessen werden, was in Abbildung 2.32 zu sehen ist.

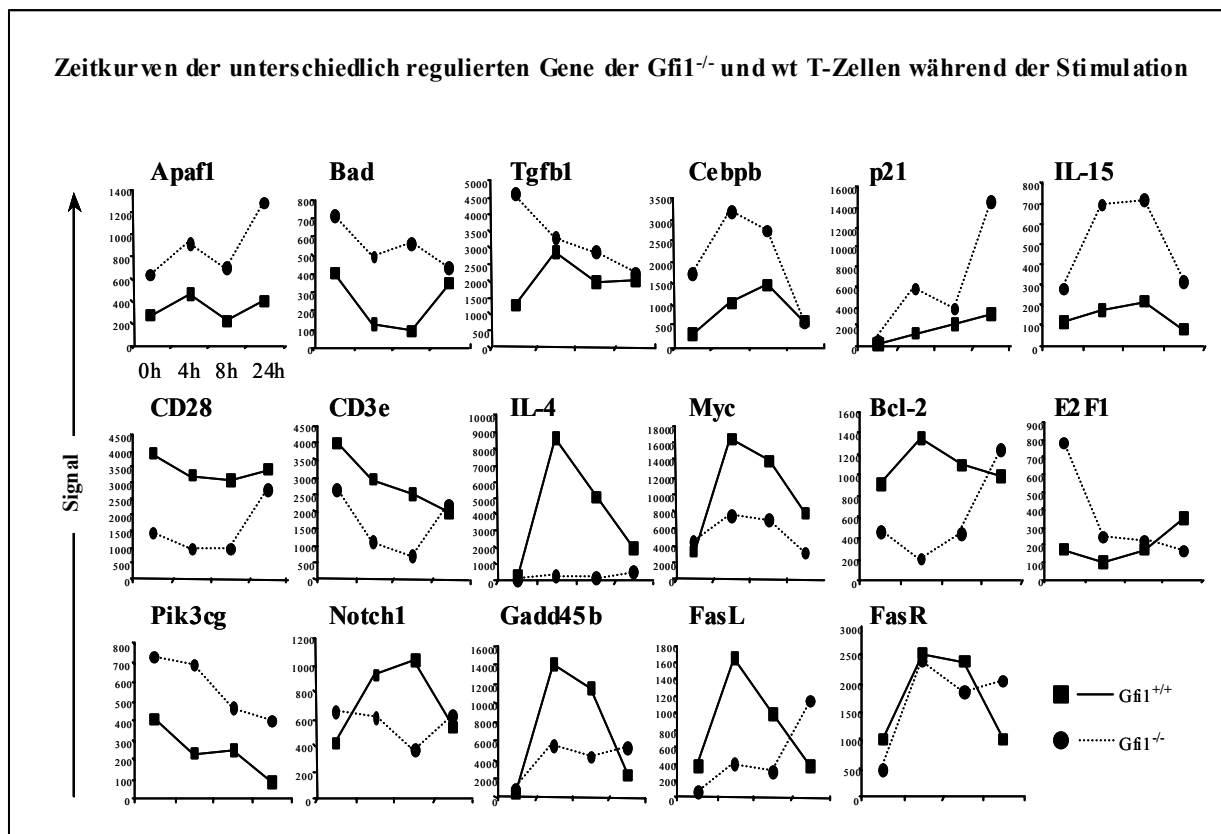


Abbildung 2.33: Expressionsverläufe der ausgewählten Gene

Darstellung der Expressionswerte für jedes einzelne Gen zu den jeweiligen Zeitpunkten der Stimulation.

2.6 Genexpressionen der unterschiedlich regulierten Gene

Um die zuvor gefundenen Ergebnisse aus dem DNA-Array zu bestätigen, wurden erneut aufgereinigte T-Zellen von einer wt und einer *Gfi1*^{-/-} Maus, analog zum DNA-Array Experiment (siehe 2.5), stimuliert und RNA isoliert. Für jeden Zeitpunkt und für jedes Gen wurde jeweils eine RT-PCR Reaktion durchgeführt (Abbildung 2.34).

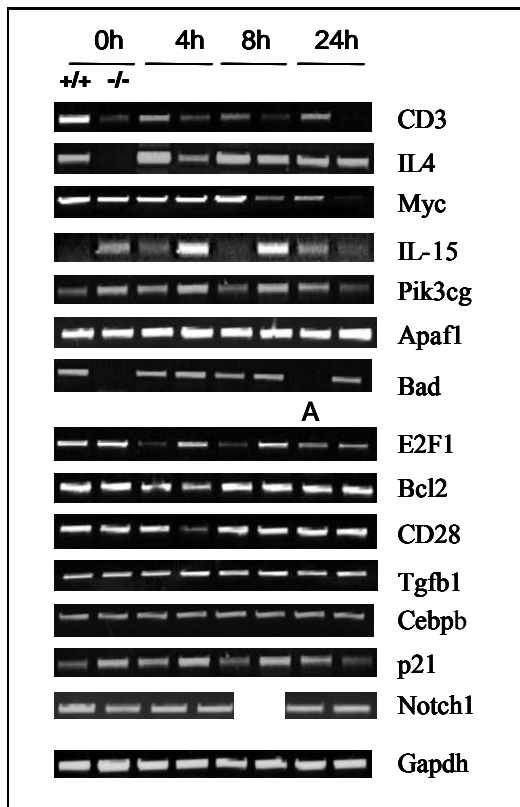


Abbildung 2.34: RT-PCR der ausgewählten Gene

Für jedes Gen und für jeden der vier Zeitpunkte, wurde eine RT-PCR Reaktion bei der entsprechenden Temperatur, mit 33 Zyklen durchgeführt. A: (absent) nicht vorhanden im DNA-Array.

Unter diesen RT-PCR Bedingungen konnte für CD3, IL-4, Myc, IL-15 und *Pi3kcg* die Expressionsunterschiede zwischen wt und *Gfi1*-defizienten T-Zellen, die im DNA-Array gefunden worden sind, fast bei allen Zeitpunkten bestätigt werden. Für Apaf1, Bad, CD28, Bcl-2, p21 und E2F1 war dies nur teilweise der Fall, da es dort an einzelnen Stimulationszeitpunkten zu Abweichungen kam. Zum Beispiel konnte für Apaf1 nur nach 24 Stunden ein geringer Expressionsunterschied gezeigt werden und p21 war in dieser RT-PCR nach 24 Stunden in *Gfi1*^{-/-} T-Zellen geringer exprimiert als in wt Zellen. In den RT-PCR Reaktionen von Tgfb1, Cebpb und Notch1 konnte unter diesen Bedingungen kein Unterschied in der Genexpressionsstärke zwischen wt und *Gfi1*-defizienten T-Zellen gefunden werden.

2.7 Real-Time PCR der unterschiedlich regulierten Gene in Gfi1-defizienten und wt T-Zellen, während der Antigenstimulation

Eine weitere Überprüfung der DNA-Array Daten für die ausgewählten, unterschiedlich regulierten Gene in Gfi1^{-/-} und wt T-Zellen während der Antigenstimulation (siehe 2.5.3), wurde mittels Real-Time PCR durchgeführt. Die Real-Time PCR stellt im Vergleich zur herkömmlichen RT-PCR eine weitaus sensitivere Methode zur Bestimmung von Genexpressionen dar. Für jedes der zuvor untersuchten Gene wurde eine Real-Time PCR in einer Dreifachbestimmung pro Stimulationszeitpunkt durchgeführt. Die Isolation und Stimulation der T-Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.5 beschrieben. Die Zyklenanzahl (CT) wurde auf den Gapdh (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase) bzw. auf den Sdhb (Succinat-Dehydrogenase b) CT-Wert bezogen und dadurch die relative Zyklenzahl (deltaCT) ermittelt. Alle durchgeführten Real-Time PCRs wurden zur Reproduktion der Ergebnisse in einem zweiten Experiment, mit einem unabhängigen Gfi1^{-/-}/wt Mauspaar, wiederholt (Abbildung 2.35)

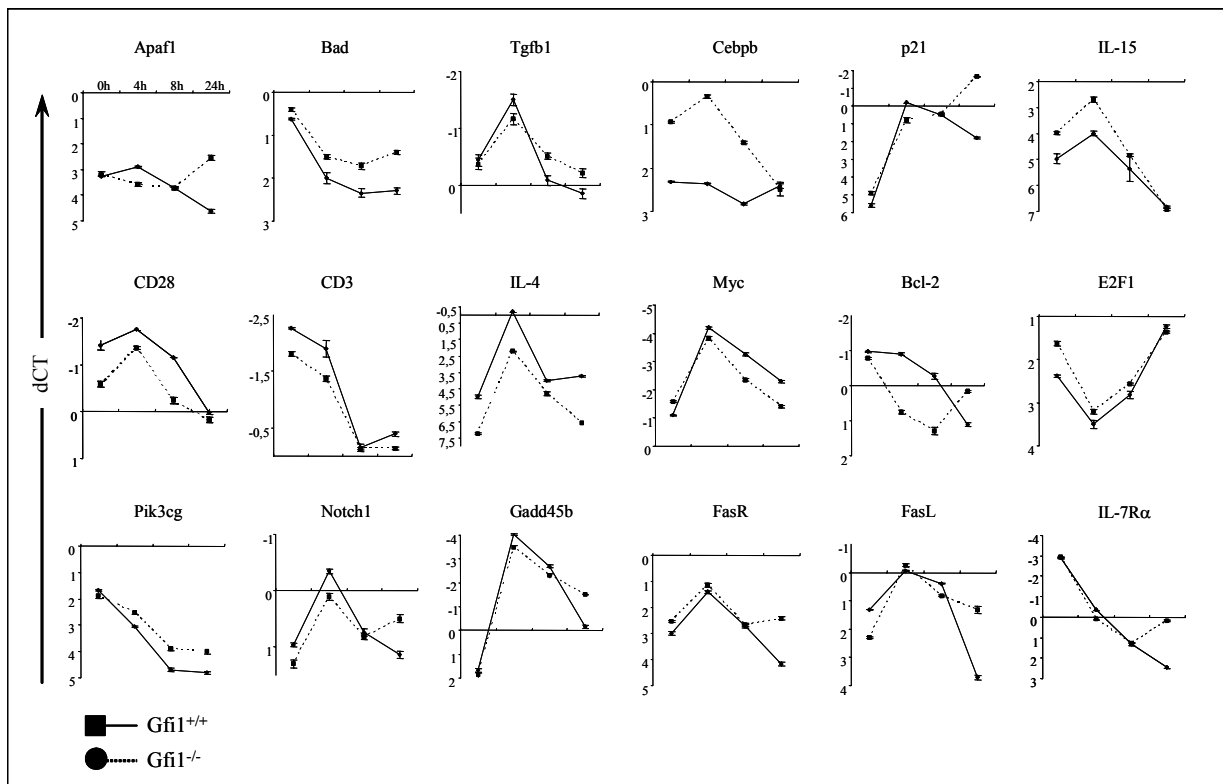


Abbildung 2.35: Real-Time PCR

Für jedes Gen und für jeden der vier Stimulationszeitpunkte wurde eine Real-Time PCR-Reaktion in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Verwendet wurden Real-Time Assays von Applied Biosystems, die über Exon-Intron-Grenzen verliefen. dCT (delta CT): Anzahl der Zyklen, die bezogen auf die Zyklenzahl der Sdhb gemessen wurden.

Für die Mehrheit der analysierten Gene konnten die Expressionsunterschiede und unterschiedlichen Verläufe, die im DNA-Array in den Gfi1^{-/-} und wt T-Zellen gefunden worden sind, bestätigt werden. Für die Gene Bad, Bcl-2, CD28, FasR, Cebpb, E2F1, IL-4, Myc, Pik3cg und Gadd45b konnte jeder zuvor im DNA-Array gefundene, verlässlich gemessene Expressionsunterschied zu jedem Zeitpunkt durch die Real-Time PCR bestätigt werden.

Für die restlichen Gene Apaf1, CD3, CD95L, IL-15 und p21 konnten, bis auf jeweils einen Zeitpunkt, alle Expressionsunterschiede zwischen Gfi1^{-/-} und wt T-Zellen detektiert werden. Ausnahmen stellten die Gene Notch1 und Tgfb1 dar. Notch1 zeigte im DNA-Array nach achtstündiger Stimulation eine niedrigere Expression in den Gfi1^{-/-} T-Zellen, die in dieser Real-Time PCR nicht bestätigt werden konnte. Allerdings wurde eine zweite Real-Time PCR mit einem unabhängigen Mauspaar durchgeführt, in der dieser Expressionsunterschied zu sehen war. Im Fall von Tgfb1, das in unstimulierten Gfi1^{-/-} T-Zellen im DNA-Array stärker als im wt exprimiert war, konnte in beiden Real-Time PCRs dieser Expressionsunterschied nicht reproduziert werden.

Die Real-Time PCRs des IL-7R bestätigten ebenso die DNA-Array Daten. Sowohl in den Gfi1^{-/-} T-Zellen, als auch in den wt T-Zellen, wurde nach der TCR-Stimulation die Expression des IL-7R schwächer. Auffällig war der Expressionsunterschied, der nach 24 Stunden zu sehen war. In den Gfi1^{-/-} T-Zellen verblieb der IL-7R nicht auf diesem geringeren Expressionslevel, sondern wurde wieder verstärkt transkribiert.

2.8 Friend Virusinfektion von Gfi1-defizienten Mäusen

Bisher wurde die Proliferationsantwort der Gfi1-defizienten T-Zellen *in vitro*, durch die Stimulation des T-Zellrezeptors untersucht und *in vivo* durch die Peptid-Stimulation TCR-transgener T-Zellen. Durch die Infektion der Gfi1^{-/-} Mäuse mit dem Friend Virus (FV), war eine Analyse der T-Zellantwort möglich, die durch eine „wirkliche“ Infektion ausgelöst wurde. Der Erythroleukämie induzierende Friend Virus bot dafür ein geeignetes Modellsystem (siehe 1.3).

2.8.1 Infektionsverlauf der Friend Virusinfektion

Die Infektionen der wt und der Gfi1^{-/-} Mäuse wurden von Prof. Dittmer und Simone Schimmer im Institut für Virologie am Universitäts-Klinikum Essen durchgeführt. Ebenso die Bestimmung der in den Abbildungen 2.36-40 und Tabelle 2.41 dargestellten Infektionsparameter. Für jedes Infektionsexperiment wurden sechs wt C57Bl/6 Mäuse und sechs Gfi1^{-/-} Mäuse, die 6-8 Wochen alt waren, verwendet. Nach der Infektion mit dem Friend Virus, wurden die Mäuse im ersten Experiment nach fünf Wochen und im zweiten Experiment nach 10 Tagen, zur Untersuchung der frühen Virusantwort, getötet und analysiert. In Abbildung 2.36 sind die Milzgewichte von nicht infizierten und infizierten Mäusen dargestellt. Vergleicht man die Gewichte der Milzen von nicht infizierten wt und Gfi1^{-/-} Mäusen miteinander, ließ sich kein Unterschied erkennen. Jedoch zehn Tage nach der Friend Virusinfektion war das Gewicht der Milzen von Gfi1^{-/-} Mäusen deutlich höher und fünf Wochen nach Infektion waren die Milzen fast dreimal so schwer wie die der wt Kontrollmäuse.

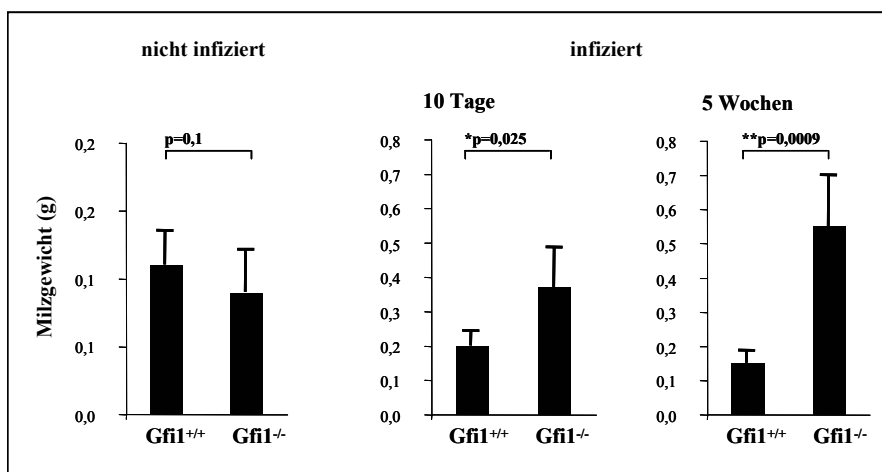


Abbildung 2.36: Milzgewichte von infizierten und nicht infizierten C57Bl/6 Mäusen

Infizierten (entweder 10 Tage oder 5 Wochen nach FV Infektion) und nicht infizierten Gfi1^{-/-} und wt Mäusen wurden die Milzen entnommen und gewogen.

In Abbildung 2.37 sind die Milzzellzahlen zehn Tage- und fünf Wochen nach FV Infektion dargestellt. In beiden Fällen war eine vermehrte Anzahl von Milzzellen in den Gfi1-defizienten Tieren zu finden.

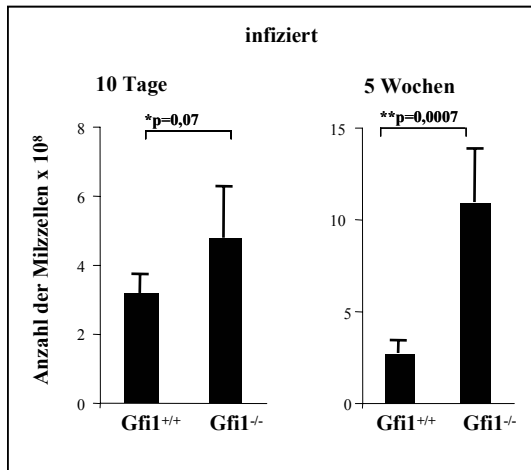


Abbildung 2.37: Bestimmung der Milzzellzahlen in FV infizierten Gfi1^{-/-} und wt Mäusen

Einzellsuspensionen aus den Milzen der infizierten Gfi1^{-/-} und wt Mäusen wurden hergestellt und die Milzzellzahlen bestimmt.

Den infizierten Gfi1^{-/-} und wt Mäusen wurde Blut entnommen und die Menge des AK34 Antikörpers bestimmt, der als Antwort auf die Friend Virusinfektion gebildet wurde. Nach zehn Tagen war die Antikörpermengung in den Gfi1^{-/-} Mäusen schon deutlich höher als in den wt Tieren und fünf Wochen nach der FV Infektion waren in den wt Mäusen keine AK34 Antikörper mehr zu detektieren, während die Menge in den Gfi1-defizienten Tieren erheblich gestiegen war (Abbildung 2.38).

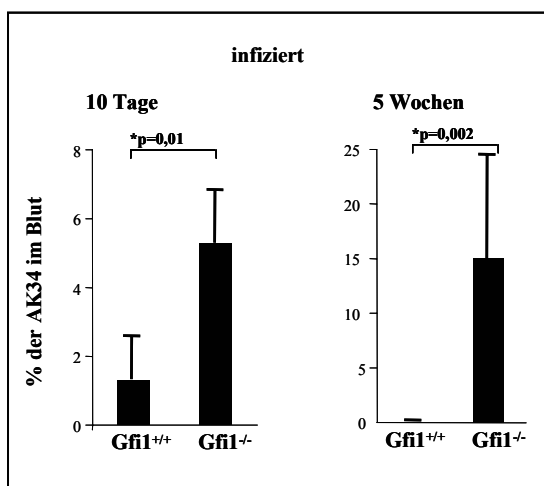


Abbildung 2.38: Bestimmung der AK34 Menge im Blut FV infizierter Gfi1^{-/-} und wt C57Bl/6 Mäuse

Die Virus spezifischen AK34 Antikörper wurden im Blut der infizierten Gfi1^{-/-} und wt Mäuse gemessen

In Abbildung 2.39 ist eine Tetramer-Färbung zu sehen, die die prozentualen Anteile der Virus spezifischen CD8⁺ T-Zellen wieder gibt. Zehn Tage nach FV Infektion waren in Gfi1^{-/-} Mäusen etwas mehr Virus spezifische CD8⁺ T-Zellen, als im wt vorhanden, wohingegen fünf Wochen nach FV Infektion der relative Anteil der Virus speziifischen CD8⁺ T-Zellen in Gfi1-defizienten Mäusen drastisch gestiegen war.

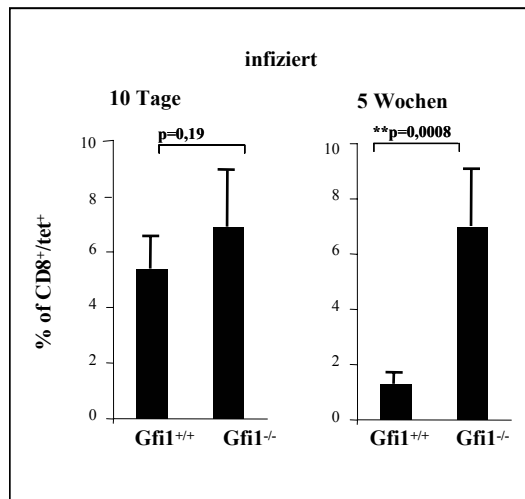


Abbildung 2.39: Tetramer Färbung FV spezifischer CD8⁺ T-Zellen

Milzzellen aus den infizierten Mäusen wurden mit CD8 Antikörpern und mit virusspezifischen Tetrameren gefärbt und im FACS ausgewertet.

In den folgenden zwei Analysen wurden die CD8⁺ T-Zellen auf CTL (cytotoxische T-Lymphocyten) Aktivität hin untersucht. Ein Indikator hierfür ist die Exposition des 107a Proteins auf der Zelloberfläche. Hierbei handelt es sich um ein granuläres Protein, dass nur nach Infektion freigesetzt wird. Zwischen wt und Gfi1^{-/-} T-Zellen war kein Unterschied in der relativen Menge des 107a Proteins zu erkennen. Betrachtet wurden hier die aktivierten, CD43⁺/CD8⁺/T-Zellen (Abbildung 2.40a). Ein weiterer Parameter für das Maß der CTL Aktivität ist die Freisetzung von GranzymB der aktivierten CD8⁺ T-Zellen. Nach zehn Tagen Infektion war eine verstärkte Produktion von GranzymB in den CD43⁺CD8⁺ Gfi1-defizienten T-Zellen im Vergleich zu wt T-Zellen zu finden (Abbildung.2.40b).

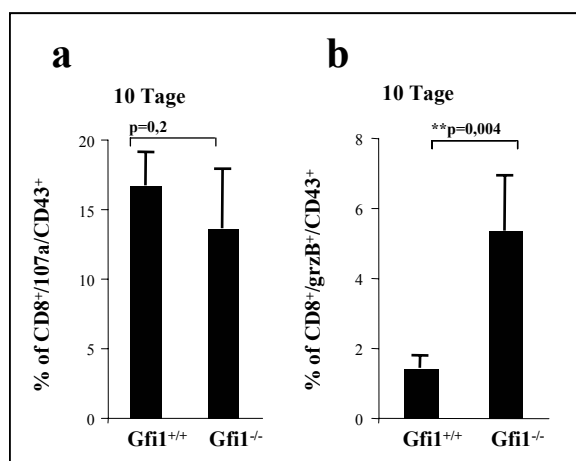


Abbildung 2.40: CTL Aktivität der FV spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Milzzellen aus Gfi1^{-/-} und wt Mäusen wurden zehn Tage nach FV Infektion mit Antikörpern gegen CD8, CD43 und CD107a (a) oder mit Antikörpern gegen GranzymB gefärbt (b).

Um zu überprüfen, ob die B-Zellantwort während der FV Infektion in Gfi1^{-/-} Mäusen normal verläuft, wurde der Titer der neutralisierenden Antikörper bestimmt, der in der Lage war, die Virusinfektion zu beseitigen. In Tabelle 2.37 ist zu erkennen, dass die B-Zellantwort in den Gfi1^{-/-} Mäusen in diesem Fall normal verlief.

	nAb
Gfi1^{+/+}	1 : 80
	1 : 80
	1 : 160
	1 : 80
	1 : 20
	1 : 80
Gfi1^{-/-}	1 : 160
	1 : 80
	1 : 80
	1 : 160
	1 : 40
	1 : 160

Tabelle 2.41: B-Zellantwort gegenüber der FV Infektion

Der Titer der neutralisierenden Antikörper wurde in den Mäusen nach 10 Tagen Infektionszeit gemessen

2.8.2 B und T-Zellen in Friend Virus infizierten Mäusen

Die Lymphocyten aus der Milz und aus den zervikalen Lymphknoten der Friend Virus infizierten Mäuse wurden mit Antikörpern gegen die Korezeptoren CD4, CD8 und CD3 gefärbt, als auch gegen das B-Zell spezifische Oberflächenantigen B220. In der Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht Analyse der gesamten Zellen, war in Gfi1^{-/-} Mäusen eine zusätzliche Population zu erkennen (R4), die in den wt Kontrolltieren nicht vorhanden war (Abbildung 2.42b).

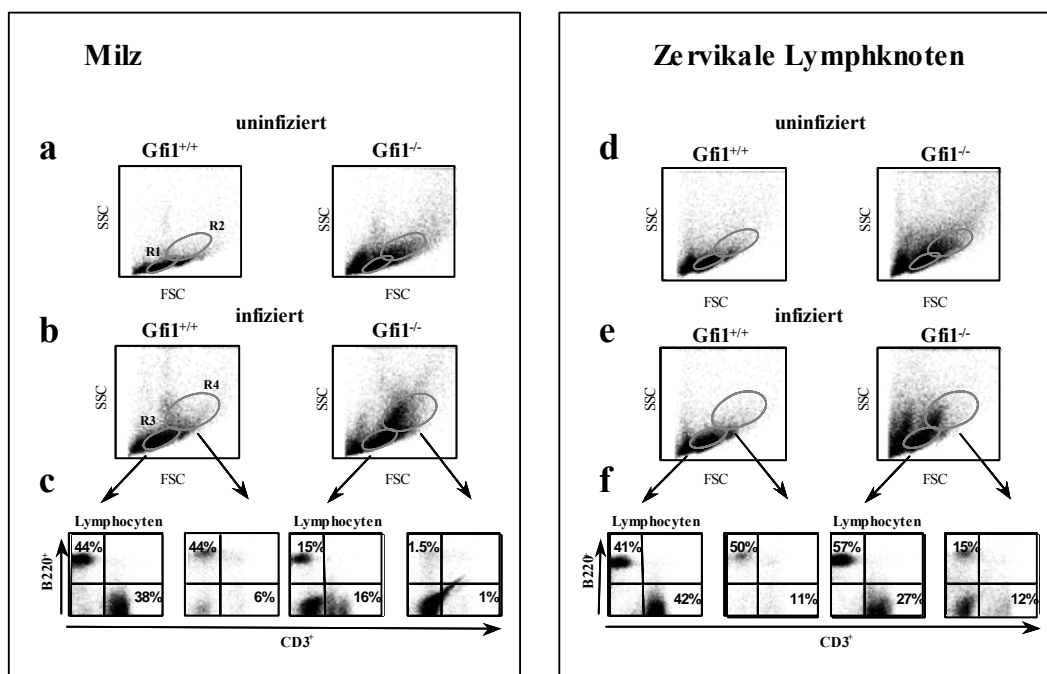


Abbildung 2.42: B- und T-Zellen in FV infizierten Mäusen

Lymphocyten wurden fünf Wochen nach FV Infektion aus der Milz (a-c) und aus den zervikalen Lymphknoten (d-f) isoliert, mit Antikörper gegen B220 und CD3 gefärbt und im FACS ausgewertet. (a/d) FSC/SSC Darstellung von nicht infizierten und infizierten Milzzellen (b/e). B220/CD3 Färbung der zwei unterschiedlichen, elektronisch ausgewählten Regionen R3 und R4 aus (b/e).

Der Vergleich mit nicht infizierten Kontrollmäusen zeigte auch hier eine zusätzliche Population (R2) im SSC/FSC Profil, die nach Virusinfektion expandierte (R4) (Abbildung 2.42a). Zur Analyse der infizierten Mäuse wurden zwei Regionen gelegt, wobei die eine Region die Lymphocytenpopulation darstellt (R3) und die andere Region (R4) die zusätzliche Population an Milzzellen. Beide elektronisch ausgewählten Regionen (R3 und R4) wurden auf Expression von CD3 und B220 hin untersucht, um die B- und T-Zellanteile innerhalb dieser Populationen zu bestimmen. In der Lymphocyten Region waren prozentual weniger B- und T-Zellen in den Gfi1-defizienten Mäusen vorhanden, da der Hauptteil der Zellen negativ für beide Oberflächen Marker war. In der Region R4 waren in Gfi1^{-/-} Mäusen fast keine B- und T-Zellen mehr vorhanden. In den wt Kontrollen lagen 44% B-Zellen in dieser Region (Abbildung 2.42c). In den Lymphknoten war der Effekt nicht ganz so stark, wie in der Milz. Allerdings war auch hier die doppelt negative Zellfraktion in den Gfi1^{-/-} Mäusen, im Vergleich zu den wt Tieren, deutlich erhöht (Abbildung 2.42d-f). Auch die relativen Anteile der CD3⁺ T-Zellen (Abbildung 2.43a) in der Milz der Gfi1-defizienten Mäuse und die Prozentwerte der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen waren, im Vergleich zum wt, stark erniedrigt (Abbildung 2.43b).

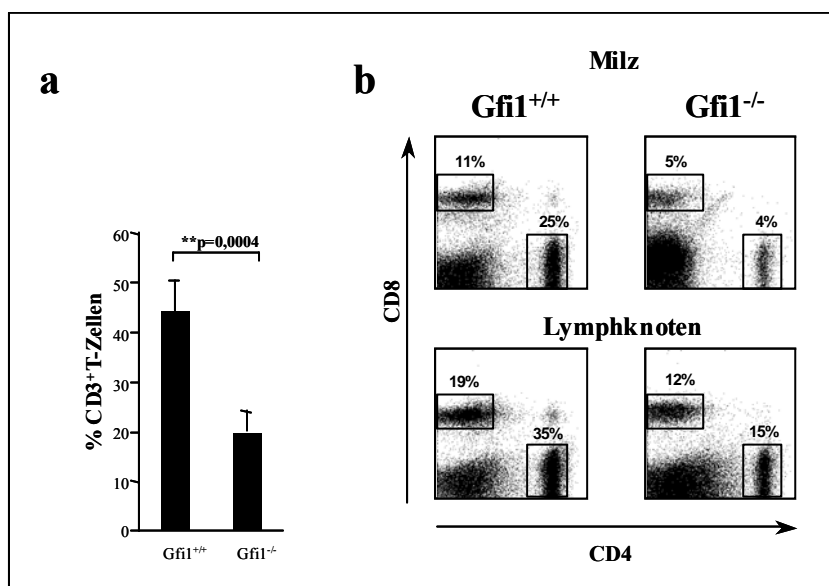


Abbildung 2.43: Prozentualer Anteil der T-Zellen in Milzen und zervikalen Lymphknoten von FV infizierten Mäusen

Nach fünfwöchiger FV Infektion wurden die Milzzellen mit CD3 Antikörper gefärbt und die prozentualen Anteile der CD3⁺ T-Zellen innerhalb der Lymphocyten gemessen (a). Zusätzlich wurden die Lymphocyten aus den Milzen und den zervikalen Lymphknoten mit CD8 und CD4 Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer ausgewertet (b).

Die Berechnung der absoluten Zellzahlen nach FV Infektion ist in Abbildung 2.44 dargestellt. Insgesamt besaßen die Gfi1^{-/-} Mäuse in etwa genauso viele T-Zellen wie die wt Mäuse, allerdings weniger CD4⁺ T-Zellen und deutlich mehr CD8⁺ T-Zellen.

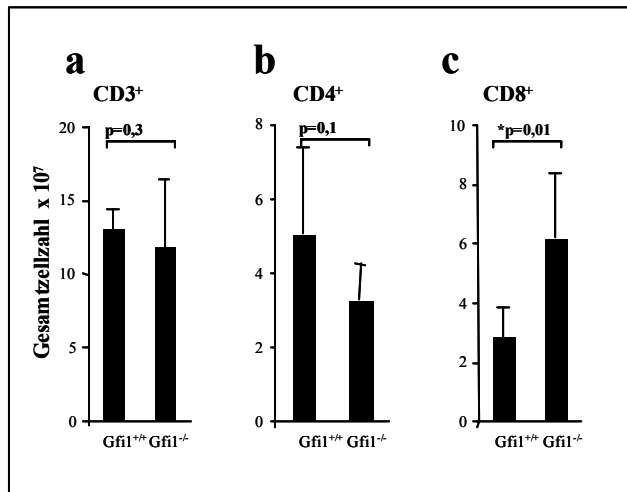


Abbildung 2.44: Gesamtzellzahlen der T-Lymphocyten nach FV Infektion

Absolute Zellzahlen der CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, nach einer Infektionszeit von 5 Wochen, aus 6 unabhängigen Mauspaaren.

Nach zehntägiger Virusinfektion fand man ebenso erniedrigte prozentuale Werte der CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen in den Gfi1-defizienten Mäusen verglichen mit wt Kontrolltieren (Abbildung 2.451a/b). Die absoluten Zellzahlen der CD3⁺ T-Zellen sind unverändert geblieben (Abbildung 2.45c), wobei weniger CD4⁺ und mehr CD8⁺ T-Zellen vorhanden waren (Abbildung 2.45d/e).

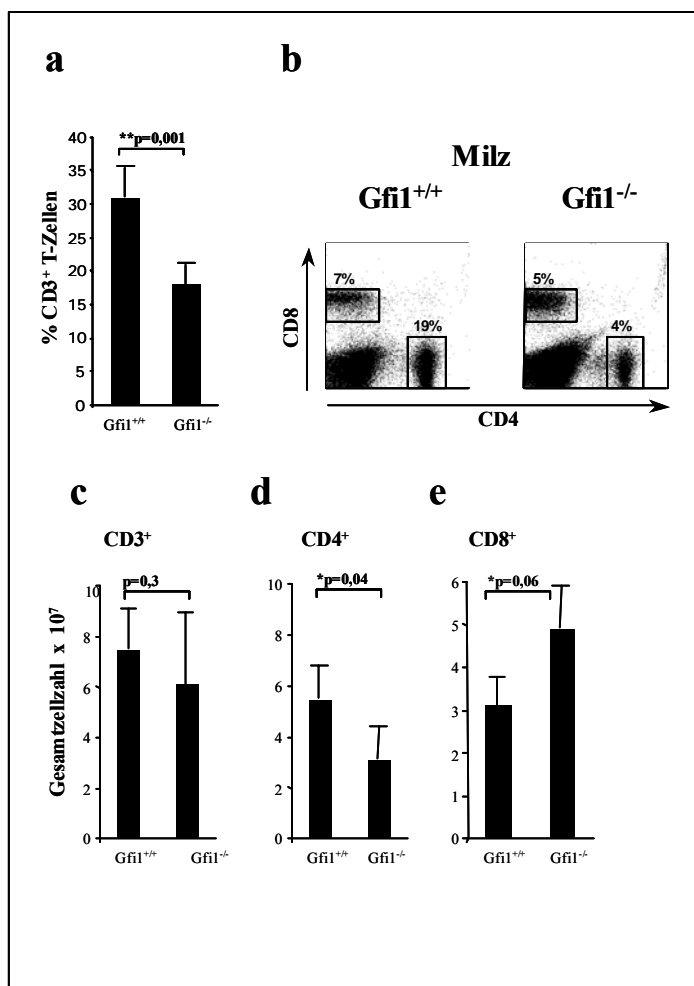


Abbildung 2.45: Analyse der T-Zellen nach zehntägiger FV Infektion

Nach einer Infektionszeit von 10 Tagen wurden Lymphocyten von wt oder Gfi1^{-/-} Mäusen mit CD3 (a), CD4 und CD8 Antikörpern (b) gefärbt und die prozentualen Anteile dieser Zellen innerhalb der Lymphocyten Population bestimmt. Berechnung der absoluten Zellzahlen der CD3⁺ (a), CD4⁺ (b) und CD8⁺ (c) T-Zellen aus 6 unabhängigen Mauspaaren.

2.8.3 Die Bildung von Gedächtnis T-Zellen nach Friend Virusinfektion

Wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, wurden Milzzellen von wt und *Gfi1*^{-/-} Mäusen mit Antikörpern gegen die Oberflächen Moleküle CD62L, CD44, CD4 und CD8 gefärbt, um die relativen Anteile der CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis T-Zellpopulationen zu bestimmen. Die Analyse der Gedächtniszellen erfolgte zehn Tage oder fünf Wochen nach FV Infektion. Im Vergleich zu wt Kontrollzellen war in infizierten *Gfi1*^{-/-} Mäusen schon nach einer Infektionszeit von zehn Tagen ein deutlicher Anstieg der CD8⁺ zentralen und Effektor Gedächtnis T-Zellen und der CD4⁺ Effektor Gedächtnis T-Zellen zu sehen (Abbildung 2.46a). Diese Erhöhung der Gedächtnis T-Zellpopulationen in den *Gfi1*-defizienten Mäusen war gegenüber wt Mäusen wesentlich größer, als in den nicht infizierten *Gfi1*^{-/-} und wt Kontrollmäusen (siehe 2.2.3). Nach einer Infektionszeit von fünf Wochen waren kaum noch CD8⁺ naive T-Zellen in *Gfi1*-defizienten Mäusen vorhanden. 60% der Zellen gehörten zur Effektor Gedächtnis T-Zellpopulation und 27% zur zentralen Gedächtnis T-Zellpopulation (Abbildung 2.46b). Innerhalb der CD4⁺ T-Zellen war der Effekt weniger stark ausgeprägt und es war kein großer Unterschied zur zehntägigen Infektion zu erkennen.

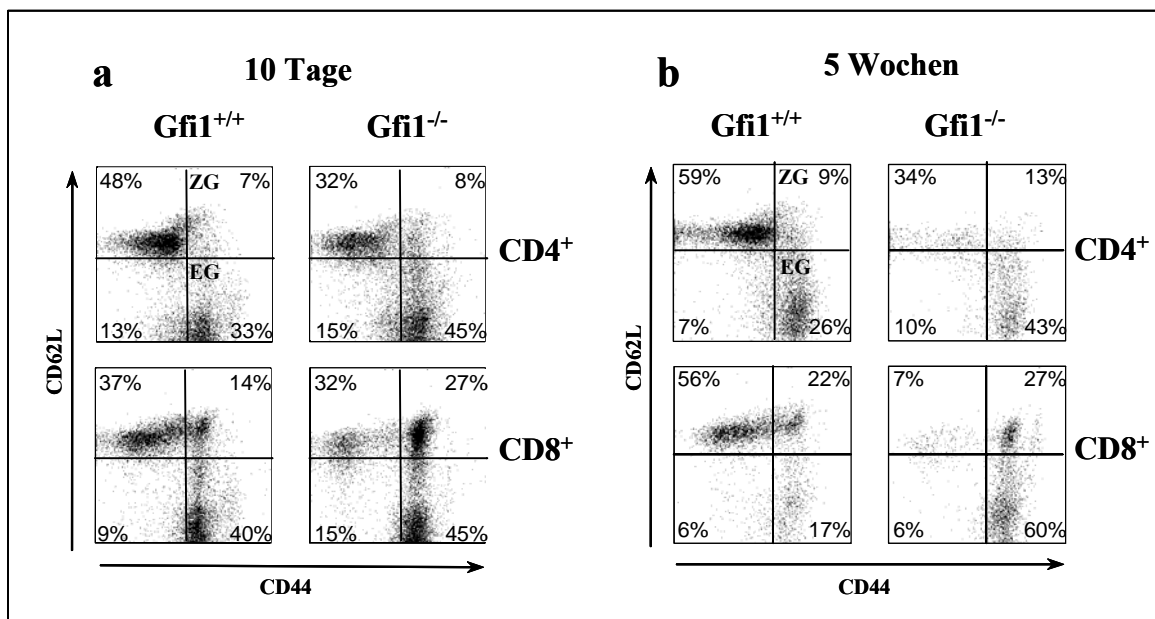


Abbildung 2.46: Gedächtnis T-Zellen in FV infizierten Mäusen

Lymphocyten aus der Milz wurden nach einer Infektionszeit von 10 Tagen (a) oder 5 Wochen (b) mit Antikörpern gegen Gedächtnis T-Zellmarker CD44 und CD62L gefärbt und der Anteil der unterschiedlichen Gedächtnis T-Zellpopulationen innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bestimmt. ZG: zentrale Gedächtnis T-Zellen; EG: Effektor Gedächtnis T-Zellen.

In Abbildung 2.47 sind die zusammenfassenden Daten der Gedächtnis T-Zellpopulationen der jeweils untersuchten sechs Mauspaare zum zehn Tage und fünf Wochen Zeitpunkt dargestellt. Nach zehn Tagen waren, bis auf die CD4⁺ zentralen Gedächtnis T-Zellen, alle

Zellpopulationen in Gfi1-defizienten Mäusen erhöht und zum fünf Wochen Zeitpunkt waren alle unterschiedlichen Gedächtnis T-Zellpopulationen (EG und ZG) prozentual vermehrt vorhanden.

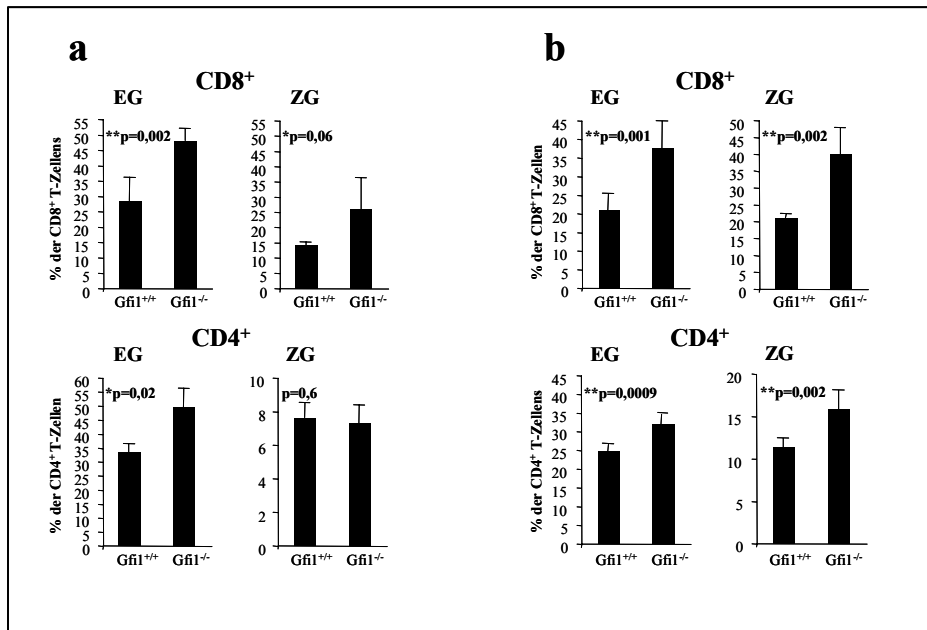


Abbildung 2.47: Prozentuale Anteile der Gedächtnis T-Zellen in FV infizierten Mäusen

Bestimmung der prozentualen Anteile der ZG und EG Populationen nach einer Infektionszeit von 10 Tagen (a) und 5 Wochen (b) innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen. Dargestellt sind Messungen von Zellen aus jeweils 6 unabhängigen Mauspaaren.

2.8.4 Die Zytokinproduktion Friend Virus infizierter T-Zellen

Um die Funktion der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen, die durch den Friend Virus aktiviert wurden, sind Milzzellen von wt und Gfi1^{-/-} Mäusen zehn Tage nach der Infektion analysiert worden. Um den Aktivierungsstatus der T-Zellen nachzuweisen, wurden diese mit einem Antikörper gegen das Oberflächenprotein CD43 gefärbt, dass in seiner glykolisierten Form nur auf aktivierten Zellen zu finden ist. In Abbildung 2.48 ist zu sehen, dass die Gfi1^{-/-} Mäuse sowohl mehr CD8⁺CD43⁺, als auch mehr CD4⁺CD43⁺ T-Zellen besaßen, wobei der Effekt stärker bei den CD8⁺ T-Zellen zu sehen war.

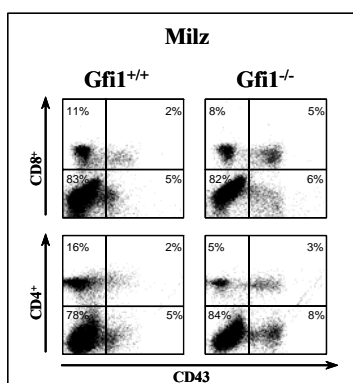


Abbildung 2.48: Aktivierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in FV infizierten Mäusen

Nach einer Infektionszeit von 10 Tagen wurden die Lymphocyten aus den Milzen mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD43 gefärbt und die Anteile an CD43⁺, aktivierten T-Zellen bestimmt.

Die Abbildung 2.49 fasst die Analyse von Zellen aus insgesamt sechs Mauspaaren zusammen und zeigt, dass Gfi1-defiziente Mäuse ungefähr die vierfache Menge an CD8⁺ aktivierten T-Zellen aufwiesen und die doppelte Menge an aktivierten CD4⁺ T-Zellen.

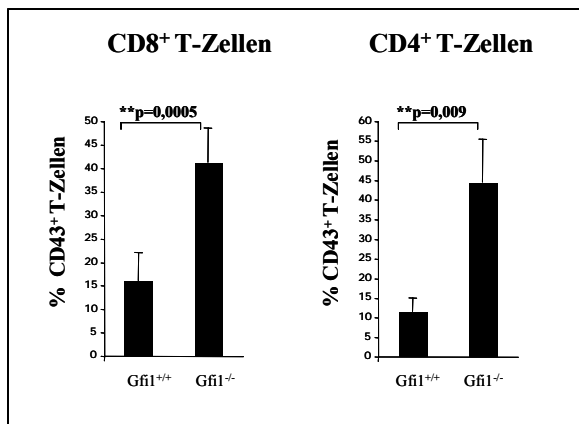


Abbildung 2.49: Prozentuale Anteile der aktivierten T-Zellen in FV infizierten Mäusen

Berechnung der prozentualen Anteile der aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus 6 unabhängigen Mauspaaren (wt/Gfi1^{-/-}).

Aktiviert T-Zellen produzieren nach ihrer Stimulation unterschiedliche Zytokine um ihre Effektorfunktion auszuüben und andere benachbarte Zellen zu aktivieren. Die Produktion von IFN γ , TNF α und IL-2 wurde in den CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen nach FV Infektion untersucht (Abbildung 2.50).

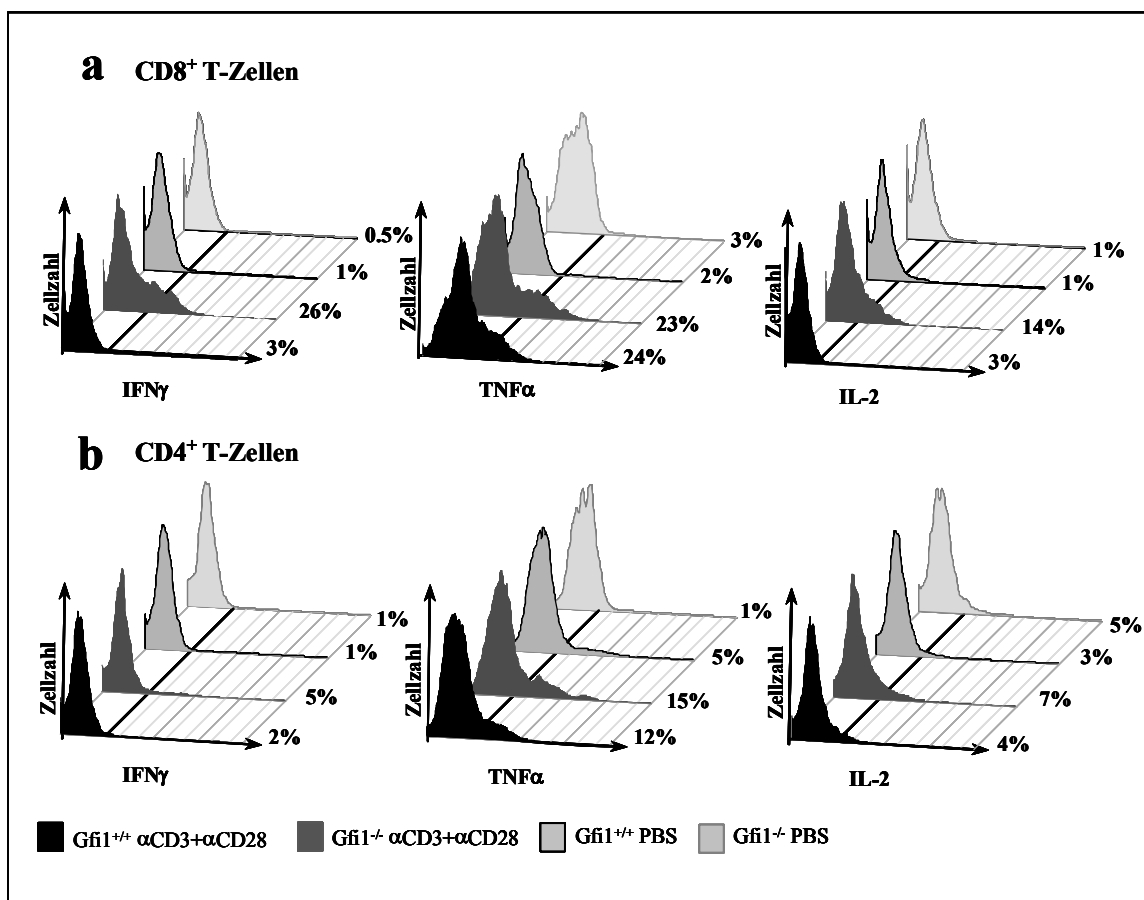


Abbildung 2.50: Zytokinproduktion der FV infizierten T-Zellen

Intrazelluläre Zytokinfärbung von CD8⁺ (a) und CD4⁺ T-Zellen (b) nach einer Infektionszeit von 10 Tagen. Für die Zytokinproduktion wurden die T-Zellen mit α CD3+ α CD28 Antikörpern restimuliert. Zur Kontrolle erfolgte die Restimulation nur mit PBS.

CD8⁺ T-Zellen aus infizierten Gfi1^{-/-} Mäusen zeigten eine deutlich erhöhte IFN γ Produktion gegenüber Zellen aus infizierten wt Mäusen. 26% der Zellen waren IFN γ positiv und in den Kontrollmäusen nur 3%. Die TNF α Produktion ist unverändert gegenüber den wt Kontrollen, wohingegen die Menge an IL-2 produzierenden, CD8⁺ T-Zellen wieder signifikant erhöht war (Abbildung 2.50a). Die Zytokinproduktion der CD4⁺ T-Zellen in Gfi1^{-/-} Mäusen war weitestgehend unverändert gegenüber wt Kontrollen. Ein leichte Erhöhung aller drei Zytokine war tendenziell zu erkennen, war jedoch bei der Betrachtung aller sechs analysierten Mauspaare statistisch nicht relevant (Abbildung 2.50b). In Abbildung 2.51 ist die Zytokinproduktion der CD8⁺ T-Zellen zusammenfassend in Balken-Diagrammen dargestellt, die die exemplarisch gezeigte Analyse in Abbildung 2.50 bestätigen.

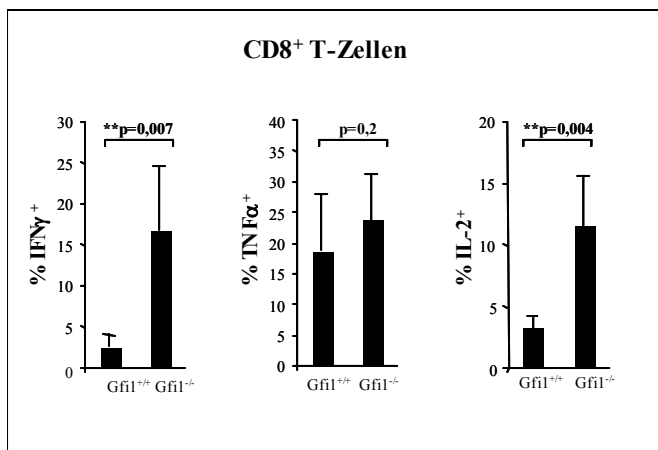


Abbildung 2.51: IFN γ , TNF α und IL-2 Produktion in FV infizierten CD8⁺ T-Zellen

Bestimmung der Zytokinproduktion in den CD8⁺ T-Zellen aus 6 unabhängigen Mauspaaren.

Um abschätzen zu können, ob die vermehrte Zytokinproduktion in den Gfi1^{-/-} Mäusen durch die aktivierten CD8⁺ T-Zellen verursacht wird, wurde die IFN γ Menge in CD8⁺CD43⁺ T-Zellen bestimmt. Es zeigte sich, dass nicht nur die Anzahl an IFN γ produzierenden Zellen erhöht war, sondern auch die Menge, die pro aktivierter CD8⁺ T-Zelle produziert wird (Abbildung 2.52).

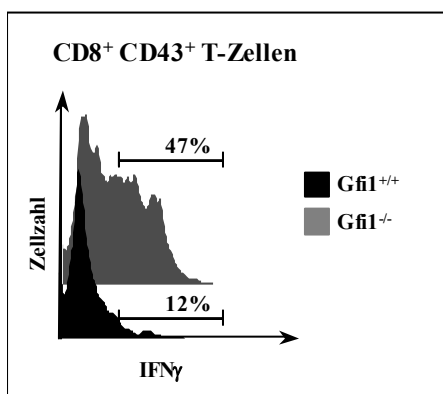


Abbildung 2.52: IFN γ Produktion in aktivierten CD8⁺ T-Zellen

CD8⁺/CD43⁺ T-Zellen wurden zuerst im FACS elektronisch ausgewählt und anschließend der Anteil an IFN γ ⁺ T-Zellen bestimmt.

2.8.5 $\gamma\delta$ T-Zellen in Friend Virus infizierten Mäusen

In Abschnitt 2.2.2 wurde gezeigt, dass in $Gfi1^{-/-}$ Mäuse eine zusätzliche Population von $\gamma\delta$ T-Zellen auftrat, die positiv für CD3 und negativ für die Korezeptoren CD4 und CD8 war. Um näheres über die Funktion und Wirkungsweise dieser Zellen zu erfahren, wurde diese Population auch in Friend Virus infizierten Milzzellen untersucht. Auch hier waren die $CD3^{+}CD4^{-}CD8^{-}$ T-Zellen vermehrt zu finden (16% in $Gfi1^{-/-}$ Mäusen und 5% in wt Mäusen) (Abbildung 2.53a). Die Populationsgrößen veränderten sich durch die Infektion nicht wesentlich und waren in derselben Häufigkeit wie in nicht infizierten Mäusen zu finden (Abbildung 2.53b). Allerdings existierte in $Gfi1$ -defizienten, infizierten Tieren eine zweite Population an Zellen (Abbildung 2.53a), die sowohl in nicht infizierten $Gfi1^{-/-}$ Mäusen, als auch in wt Mäusen nicht vorhanden war. Diese T-Zellen waren $CD3^{+}CD8^{-}CD4^{+}$ und machten ca. 6% der $CD3^{+}$ T-Zellpopulation aus. Wie auch bei der $CD3^{+}CD8^{-}CD4^{-}$ Population handelte es sich hierbei um $\gamma\delta^{+}$ T-Zellen (Abbildung 2.53c). In Abbildung 2.53d ist der prozentuale Anteil dieser Population an den $CD3^{+}$ T-Zellen in den sechs analysierten Mauspaaren gezeigt und die Abbildung 2.53e gibt die relativen Anteile der $\gamma\delta^{+}$ T-Zellen in nicht infizierten Mäusen wieder.

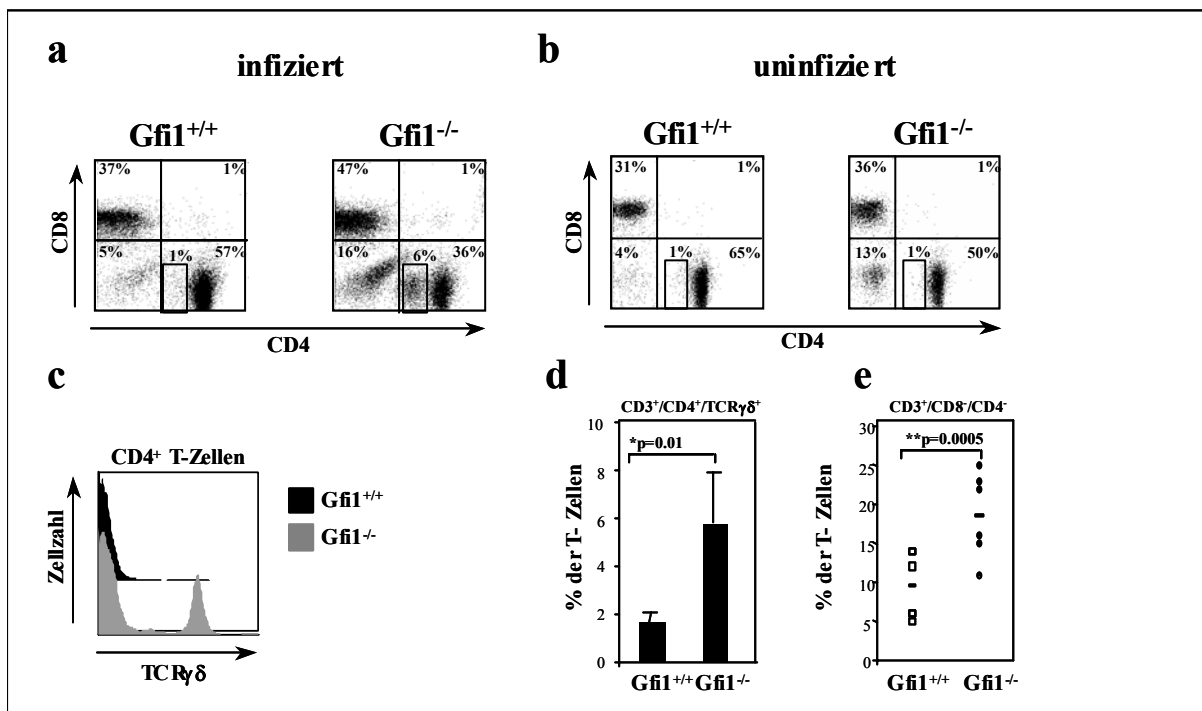


Abbildung 2.53: $\gamma\delta$ T-Zellen in FV infizierten Mäusen

Lymphocyten aus Milzen von infizierten wt und $Gfi1^{-/-}$ Mäusen (10 Tage Infektionszeit) wurden mit Antikörpern gegen CD4, CD8, CD3 und TCR $\gamma\delta$ gefärbt und im FACS ausgewertet. (a) CD4/CD8 Darstellung von infizierten $CD3^{+}$ T-Zellen und von nicht infizierten $CD3^{+}$ Kontrollzellen (b). (c) Bestimmung der $\gamma\delta^{+}$ T-Zellen innerhalb der elektronisch ausgewählten $CD4^{+}$ T-Zellpopulation. (d) Berechnung der prozentualen Anteile, der in (a) dargestellten $CD3^{+}CD8^{-}CD4^{+}$ $\gamma\delta^{+}$ T-Zellpopulation in infizierten Mäusen (e) Berechnung der prozentualen Anteile, der $CD3^{+}CD4^{-}CD8^{-}$ T-Zellpopulation in nicht infizierten Kontrollmäusen.

3 Diskussion

3.1 Gfi1 beeinflusst die Zusammensetzung der peripheren T-Zellpopulationen

Der transkriptionelle Repressor Gfi1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der T-Lymphocyten im Thymus. Im Vergleich zu anderen Organen ist das Expressionsniveau in unreifen Thymocyten sehr hoch (Gilks *et al.*, 1993; Grimes *et al.*, 1996) und nimmt erst in reifen, einzel positiven (SP) CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ab (Schmidt *et al.*, 1998). Die Entwicklung eines Gfi1 „Knock Out“ Mausmodelles ermöglichte eine detaillierte Untersuchung der Funktion des Gfi1 Transkriptionsfaktors während der Entwicklung der T-Zellen. Gfi1^{-/-} Mäuse besitzen einen drastisch verkleinerten Thymus, der durch eine erhöhte Apoptoserate in den c-kit⁺ Zellen, besonders in den frühen, zytokinabhängigen DN1 und DN2 Populationen, zustande kommt (Yücel *et al.*, 2003). Eine weitere Auffälligkeit in den Gfi1^{-/-} Thymi ist die Verschiebung des prozentualen Verhältnisses der CD4⁺ zu CD8⁺ Thymocyten. Gfi1-defiziente Mäuse besitzen mehr CD8⁺ und weniger CD4⁺ Thymocyten. Gfi1 ist also ein wichtiger Faktor für die normale Reifung der Vorläuferzellen und wird für die Differenzierung dieser T-Zellen benötigt. Verlassen nun die reifen T-Zellen den Thymus und gelangen in die Peripherie, zirkulieren sie dort, bis sie auf das passende Antigen treffen und zu Effektorzellen werden.

Die Analyse der naiven, nicht aktivierten T-Zellen in Gfi1^{-/-} Mäusen zeigte auch hier, wie im Thymus, einen deutlichen Unterschied in der Zusammensetzung der verschiedenen T-Zellpopulationen. Insgesamt besaßen die Gfi1^{-/-} Mäuse weniger Lymphocyten in der Milz. Auch die Gesamtzahl der CD3⁺, CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen ist verringert. Ursache hierfür könnte die verminderte Anzahl an reifen SP Thymocyten sein, die den Thymus in die Peripherie verlassen. So sind insgesamt weniger CD3⁺ T-Zellen in den Gfi1^{-/-} Mäusen, im Vergleich zu wt Tieren, vorhanden. Eine genauere Analyse der CD3⁺ T-Zellen zeigte in den Gfi1^{-/-} Mäusen eine Verschiebung der relativen Anteile der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. In der Milz von Gfi1-defizienten Tieren sind prozentual mehr CD8⁺ und weniger CD4⁺ T-Zellen vorhanden. Ursache hierfür könnte die veränderte Entwicklung der DP zu SP Thymocyten während der positiven Selektion in Gfi1^{-/-} Mäusen sein. Ein Zytokin, das bei der Entwicklung der T-Zellen in die CD8 Richtung eine wichtige Rolle spielt, ist Interleukin 7 (IL-7) (Bosselut *et al.*, 2001). Gfi1^{-/-} Mäuse besitzen eine größere Menge IL-7Rα⁺ T-Zellen innerhalb der DP

Population, was auf eine erhöhte positive Selektion der CD8⁺ T-Zellen hindeuten könnte. Auch SP CD8⁺ T-Zellen zeigen eine deutlich höhere Menge des IL-7 Rezeptors (Yücel *et al.*, 2003). Die Folge der gestörten T-Zellentwicklung im Thymus wäre, dass mehr CD8⁺ T-Zellen in die Peripherie entlassen werden, als es in den wt Mäusen der Fall ist. In Gfi1^{-/-} Mäusen sind prozentual mehr CD3⁺CD8⁺ T-Zellen vorhanden, wohingegen die absolute Zellzahl erniedrigt ist. Ursache hierfür ist, die verringerte Gesamtzellzahl der CD3⁺ T-Zellen in den Gfi1^{-/-} Mäusen. Die CD8⁺ T-Zellen in Gfi1-defizienten Mäusen zeigen eine erhöhte IL-7R Expression im Gegensatz zu naiven CD4⁺ T-Zellen (Park *et al.*, 2004). IL-7 ist für das Überleben der naiven T-Zellen in der Peripherie essentiell und steuert den Prozess der T-Zell Homöostase (Marrack *et al.*, 2000; Jameson, 2002). Es wird von Stromazellen, Monocyten und einigen Epithelzellen produziert (Hofmeister *et al.*, 1999). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Stimulation naiver T-Zellen mit IL-7 zu einer reduzierten IL-7R Expression führt, so dass T-Zellen, die durch IL-7 Kontakt das essentielle Überlebenssignal erhalten haben, nicht mit anderen T-Zellen um das vorhandene IL-7 konkurrieren, die noch keinen Kontakt mit dem Zytokin hatten (Park *et al.*, 2004). Dieser Prozess führt in der Peripherie zum Erhalt der maximalen Anzahl von verschiedenen T-Zellen mit unterschiedlichen TCRs. Da die Gfi1-defizienten CD8⁺ T-Zellen mehr IL-7R auf ihrer Oberfläche tragen (Park *et al.*, 2004), könnten sie einen Überlebensvorteil gegenüber CD4⁺ Gfi1-defizienten T-Zellen haben, die sogar eine verringerte Menge des IL-7R exprimieren. Der IL-7 Rezeptor stellt so ein mögliches Zielgen von Gfi1 dar. Interessanterweise führt die Stimulation von naiven T-Zellen mit IL-7 zu einer erhöhten Gfi1 Expression, wobei angenommen wird, dass Gfi1 in CD8⁺ T-Zellen die Transkription des IL-7R Gens reprimiert (Park *et al.*, 2004). Diese Annahme wird durch die Existenz von zwei putativen Gfi1 Bindestellen in den Introns 2 und 4 des murinen und humanen IL-7R Gens unterstützt. Zusätzlich konnten in Chromatin Immunopräzipitationen gezeigt werden, dass Gfi1 an den IL-7R Locus bindet (Park *et al.*, 2004; unveröffentlichte Daten). In der hier vorgestellten Arbeit konnte jedoch, nach α CD3+ α CD28 Stimulation des T-Zellrezeptors, kein Unterschied in der IL-7R Expression zwischen wt und Gfi1^{-/-} T-Zellen gefunden werden. Es ist daher unwahrscheinlich, dass der IL-7R ein direktes Zielgen von Gfi1 ist.

Zusätzlich zu den CD3⁺/CD4⁺ und CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen in der Milz fiel eine weitere Population in den Gfi1^{-/-} Milzen auf, die in dieser Art nicht in wt Mäusen vorhanden war. Diese Population trug den CD3 Rezeptor, ist aber negativ für die Korezeptoren CD4 und CD8. Eine detaillierte Untersuchung dieser Zellen zeigte, dass es sich hierbei nicht um

gewöhnliche $\alpha:\beta$ T-Zellen handelte, sondern um die seltener vorkommenden $\gamma:\delta$ T-Zellen. Da sich bei den vorherigen Analysen der T-Zellen in der Peripherie gezeigt hatte, dass der Thymus-Phänotyp der Gfi1-defizienten Mäuse eine erhebliche Rolle für die Zusammensetzung der peripheren T-Zellen spielt, wurde auch hier der Thymus der Gfi1^{-/-} Mäuse genauer betrachtet. Schon einige Zeit zuvor wurde in den Thymi der Gfi1^{-/-} Mäuse eine zusätzliche Population innerhalb der DN T-Zellen gefunden (Yücel *et al.*, 2003). Es wurde angenommen, dass es sich hierbei um Zellen handelt, die durch einen Entwicklungsblock der DN1 zu DN2 T-Zellen akkumulieren. Unterstützt wurde diese Annahme von einer reduzierten DN2 Population in den Gfi1-defizienten Tieren. Diese Zellen exprimieren CD44 auf ihrer Oberfläche, haben eine geringere CD25 Expression und tragen den IL-7 Rezeptor. Es war nun interessant herauszufinden, ob es sich hierbei um $\gamma:\delta$ T-Zellen handelt oder um konventionelle $\alpha:\beta$ T-Zellen, die einen Entwicklungsdefekt zeigen. Die Analyse der Zellen zeigte, dass es sich bei dieser T-Zellpopulation tatsächlich um $\gamma:\delta$ T-Zellen handelte. Um herauszufinden, ob es sich bei den $\gamma:\delta$ T-Zellen in der Milz um dieselben Zellen handelte, die im Thymus zu finden waren, wurden die $\gamma:\delta$ T-Zellen der Milz mit Antikörpern gegen den IL-7 Rezeptor, gegen CD44 und gegen CD25 gefärbt. Auch diese Zellen trugen den IL-7 Rezeptor, waren CD44⁺ und exprimierten eine geringe Menge an CD25. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass es sich bei der zusätzlichen Population in der Milz um die $\gamma:\delta$ T-Zellen aus dem Thymus handelt. Um diese These eindeutig zu bestätigen, müssten allerdings die Zellen aus dem Thymus isoliert, markiert, und anschließend in Empfängermause transplantiert werden. Die Milzen dieser Mäuse müssten dann in auf diese Population hin untersucht werden.

Die gefundenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Gfi1 eine Rolle bei der Umordnung der TCR Gene spielen könnte und als transkriptioneller Repressor Zielgene des $\gamma:\delta$ Locus reprimieren könnte. Die verringerte DN2 Population könnte also durch eine Verschiebung der Entwicklung der T-Zellvorläufer in die $\gamma:\delta$ Richtung zustande kommen, wobei es sich um einen durch Gfi1 verursachten, primären Entwicklungsdefekt handeln würde. Um dies zu bestätigen müssten die $\gamma:\delta$ und $\alpha:\beta$ Loci der frühen DN Populationen hinsichtlich der Genumordnungen in wt und Gfi1^{-/-} Mäusen untersucht werden, da noch nicht eindeutig klar ist, zu welchen Zeitpunkt sich die $\gamma:\delta$ T-Zellen im Thymus entwickeln.

Neuere Untersuchungen von Gfi1^{-/-} Mäusen, deren Eltern mit Antibiotika behandelt wurden, zeigten bei der Analyse einen veränderten Thymus Phänotyp. In diesen Mäusen konnte die zusätzliche $\gamma:\delta$ T-Zellpopulation im Thymus nicht gefunden werden. Es wäre also möglich, dass diese $\gamma:\delta$ T-Zellen aufgrund einer nicht entdeckten Infektion der Gfi1^{-/-} Mäuse in den

Thymus eingewandert sind und nicht die Folge eines Entwicklungsdefekts sind. Ebenso sind in diesen Mäusen keine $\gamma:\delta$ T-Zellen in der Milz vorhanden, was die Annahme unterstützt, dass die zuvor analysierten Mäuse schon präaktiviert worden sind und es zu einer Infiltration der Milz und des Thymus mit $\gamma:\delta$ T-Zellen gekommen ist. Um dies genauer zu untersuchen, wäre eine Analyse weiterer $Gfi1^{-/-}$ Mäuse nötig, die Nachkommen der Antibiotika behandelten Tiere sind.

3.2 $Gfi1$ spielt eine Rolle bei der Bildung des immunologischen Gedächtnisses

Um $CD3^{+}$ T-Zellen in den $Gfi1^{-/-}$ Mäusen genauer zu untersuchen, wurden die relativen Anteile an naiven, zentralen und Effektor Gedächtnis T-Zellen bestimmt. Naive T-Zellen tragen den „Homing“ Rezeptor CD62L und sind für den Oberflächenmarker CD44 negativ, wohingegen Gedächtnis T-Zellen $CD44^{hi}$ sind. Allerdings verlieren die Effektor Gedächtniszellen ihren „Homing“ Rezeptor CD62L und lassen sich so von zentralen Gedächtniszellen unterscheiden. $Gfi1$ -defiziente Mäuse haben einen geringeren Anteil an naiven T-Zellen und erhöhte relative Anteile an zentralen und Effektor Gedächtniszellen als wt Mäuse (siehe 2.2.3). Dies ist sowohl für die $CD8^{+}$, als auch für die $CD4^{+}$ T-Zellen der Fall und zeigte sich zusätzlich in den zervikalen Lymphknoten. Zur weiteren Charakterisierung der Gedächtnis T-Zellen wurden die $CD8^{+}$ Gedächtniszellen mit Antikörpern gegen die IL-2/IL-15R β Kette (CD122) und die $CD4^{+}$ T-Zellen mit Antikörpern gegen das CD45Rb Molekül, dass auf Gedächtnis T-Zellen nur noch in geringem Maße vorhanden ist, gefärbt. Auch hier zeigte sich, dass erheblich mehr $CD8^{+}CD122^{+}$ Gedächtnis T-Zellen in $Gfi1^{-/-}$ Mäusen vorhanden sind und dass die Population der $CD4^{+}CD45Rb^{lo}$ T-Zellen in den $Gfi1$ -defizienten Mäusen gegenüber wt Mäusen angereichert ist. Um zu untersuchen, ob die beobachteten Veränderungen in den Gedächtnis-T-Zellpopulationen der $Gfi1^{-/-}$ Mäuse durch den Verlust des Proteins zustande kommen, wurden die $Gfi1$ KO Mäuse mit „vav- $Gfi1$ “ Transgenmäusen gekreuzt. Die Nachkommen dieser vav- $Gfi1/Gfi1^{-/-}$ Mäuse reexprimieren $Gfi1$ in den hämatopoetischen Zellen. Diese Reexpression von $Gfi1$ durch das Transgen konnte zum größten Teil die wt Häufigkeiten von Gedächtnis T-Zellen in $Gfi1^{-/-}$ Mäusen wieder herstellen. Eine Ausnahme bildeten die $CD4^{+}$ Gedächtniszellen, die in den doppelt

transgenen *vav-Gfi1/Gfi1^{-/-}* Mäusen, im Vergleich zu *wt* und *Gfi1^{-/-}* Mäusen, in größerer Menge vorhanden waren. Eine Ursache hierfür könnte zum einen eine zu geringe Menge der *Gfi1* Expression in diesen Zellen sein und zum anderen wäre es möglich, dass *Gfi1* in dieser Gedächtnis T-Zellpopulation der zervikalen Lymphknoten keine Rolle für die Ausbildung der Gedächtnis T-Zellen spielt.

Es gibt mehrere unterschiedliche Faktoren, die die Aufrechterhaltung der Gedächtnis T-Zellpopulationen beeinflussen. Drei Zytokine spielen hierbei eine Schlüsselrolle. Es handelt sich um die Interleukine 15 (IL-15), 7 (IL-7) und 2 (IL-2). *CD8⁺* Gedächtnis T-Zellen, die *in vivo* als auch *in vitro* mit IL-15 stimuliert werden, beginnen sich in erhöhtem Maße zu teilen (Sprent *et al.*, 2000). Diese TCR unabhängige Proliferation bezeichnet man als „Bystander“-Proliferation. Während IL-15 die Teilung der Gedächtnis T-Zellen steuert, bewirkt Interleukin 2 (IL-2) genau das Gegenteil in diesen Zellen. Es ist ein Inhibitor der Gedächtnis T-Zellteilung (Ku *et al.*, 2000) und führt zum Absterben der Zellen. Beide Zytokine konkurrieren um denselben Rezeptor *CD122* (IL-2/IL-15R β), der vermehrt auf *CD8⁺* Gedächtniszellen vorkommt. Die größere Gedächtnis T-Zellpopulation in den *Gfi1*-defizienten Mäusen könnte also eine Folge einer erhöhten Bystander Proliferation sein, zumal die DNA-Array Daten der stimulierten T-Zellen eine erhöhte Produktion an IL-15 in den *Gfi1^{-/-}* T-Zellen zeigt (siehe 2.5.3). Die Population an *CD8⁺CD122⁺* T-Zellen in den *Gfi1^{-/-}* Mäusen ist ebenfalls erhöht, so dass IL-15 die Proliferation dieser Gedächtniszellen unterstützen kann. *CD122* ist allerdings auf naiven und *CD4⁺* Gedächtniszellen weniger stark als auf *CD8⁺* T-Zellen exprimiert, so dass die erhöhte Menge an *CD4⁺* Gedächtniszellen in *Gfi1*-defizienten Mäusen auf diese Weise nicht erklärt werden kann. Auch werden die erhöhten Gedächtnis T-Zellpopulationen ohne vorherige Stimulation gefunden, also zu einem Zeitpunkt, an dem die IL-15 Produktion der *Gfi1^{-/-}* T-Zellen eher denen der *wt* Zellen gleicht. Erst vier Stunden nach der Stimulation sieht man einen Unterschied in der IL-15 Expression zwischen *wt* und *Gfi1^{-/-}* T-Zellen.

Eine andere Möglichkeit ist, dass die große Anzahl an Gedächtnis T-Zellen durch die etwas stärkere Expression des IL-7R auf der Oberfläche dieser Zellen zustande kommt. IL-7 induziert nicht die Zellteilung der Gedächtnis T-Zellen, sondern bietet ihnen ein essentielles Überlebenssignal (Schluns *et al.*, 2000). Dadurch, dass es in den *Gfi1^{-/-}* Mäusen sowohl mehr *CD8⁺IL-7R⁺* T-Zellen gibt, als auch eine stärkere IL-7R Expression pro *CD8⁺* T-Zelle, ist es möglich, dass diese Zellen durch IL-7 vermehrt stimuliert werden können und so in erhöhtem Maße Überlebenssignale erhalten. Interessanterweise scheint IL-7 nicht nur ein

Überlebenssignal zu sein, sondern es ist auch für die aktive Bildung der Gedächtnis T-Zellen verantwortlich. Eine geringe Anzahl von $CD8^+$ Effektorzellen exprimiert den IL-7 Rezeptor auf ihrer Oberfläche und es konnte gezeigt werden, dass gerade diese Effektorzellen das Potential besitzen, sich zu langlebigen Gedächtniszellen zu entwickeln (Kaech *et al.*, 2003). Wenn in den $Gfi1^{-/-}$ Mäusen diese Population an T-Zellen stärker vorhanden ist, so könnten sich daraus vermehrt Gedächtnis T-Zellen bilden. Allerdings besitzen die $CD4^+$ Gedächtnis T-Zellen keine erhöhte IL-7R Expression auf ihrer Oberfläche und es existieren in den $Gfi1$ -defizienten Mäusen sogar weniger $CD4^+IL-7R^+$ Gedächtnis T-Zellen, so dass dies nicht der einzige Grund für das vermehrte Auftreten von Gedächtnis T-Zellen sein kann. Zusätzlich konnten, im Gegensatz zu den 2004 veröffentlichten Daten von Park *et al.*, in den Analysen der peripheren $CD8^+$ T-Zellen nur eine sehr geringe Erhöhung der $IL-7R^+$ T-Zellen gefunden werden.

Um die aktive Bildung der Gedächtnis T-Zellen zu untersuchen, sind weitere Versuche geplant in denen sowohl $Gfi1$ -defiziente, als auch wildtyp OT-I und OT-II TCR transgene Mäuse mit Ova-Peptid injiziert werden und nach fünf Wochen die Gedächtnis T-Zellbildung analysiert wird. Erste Hinweise, dass in $Gfi1^{-/-}$ Mäusen eine vermehrte Bildung dieser Zellen stattfindet, konnte durch die Infektion der Mäuse mit dem Friend Virus gezeigt werden. Hier hatten sich vermehrt Gedächtnis T-Zellen in den $Gfi1^{-/-}$ Mäusen gebildet (siehe 2.8.3). Allerdings ist dies wahrscheinlich auf die erhöhte Viruslast in den Mäusen zurückzuführen, die zu einer ständigen Stimulation der T-Zellen führte. Untersuchungen zur Apoptose in den verschiedenen Gedächtnis T-Zellpopulationen zeigten keinen Unterschied zwischen $Gfi1^{-/-}$ und wt T-Zellen. Es sind also nicht mehr Gedächtniszellen in den $Gfi1^{-/-}$ Mäusen vorhanden, weil diese besonders resistent gegenüber Apoptose sind (siehe 2.2.4).

Das heutige Wissen über die Entstehung und Homöostase der Gedächtnis T-Zellen stützt sich zum größten Teil auf Untersuchungen der $CD8^+$ T-Zellen. Über die Entwicklung der $CD4^+$ Gedächtnis T-Zellen und über die Faktoren, die das Überleben dieser Zellen steuern, ist noch sehr wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass Zytokine, wie IL-2, IL-4, IL-9, und IL-15 höchstwahrscheinlich keine Rolle für die Bildung der $CD4^+$ Gedächtnis T-Zellen spielen (Lantz *et al.*, 2000). Es gibt jedoch Hinweise, dass IL-7 das Überleben der $CD4^+$ Gedächtnis T-Zellen beeinflusst (Seddon *et al.*, 2003). Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass das Zinkfingerprotein $Gfi1$ ein Faktor ist, der die Bildung und den Erhalt von $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtnis T-Zellpopulationen beeinflusst.

3.3 Gfi1 steuert die T-Zellantwort

Erste Hinweise, dass Gfi1 nicht nur ein regulatorisches Molekül der T-Zellentwicklung darstellt, sondern auch eine Rolle in den naiven peripheren T-Zellen spielt, lieferten Experimente mit stabilen Jurkat Zell-Linien, die konstitutiv Gfi1 überexprimierten. Das hohe Gfi1 Expressionsniveau beschleunigte nach der Stimulation den Eintritt der Zellen in die S-Phase und die Zellen waren deutlich resistenter gegenüber induzierter Apoptose (Karsunky *et al.*, 2002). Um die T-Zellantwort der Gfi1-defizienten Zellen zu untersuchen, wurden diese zunächst *in vitro* mit α CD3+ α CD28 Antikörper stimuliert. Unter diesen Bedingungen sollten die T-Zellen in die Proliferationsphase übergehen, da sie durch die α CD3 Antikörper das stimulatorische Signal erhalten und durch die α CD28 Antikörper das notwendige kostimulatorische Signal. Die Analyse der Zellen nach 48 Stunden zeigte jedoch, dass im Gegensatz zu den Gfi1^{-/-} T-Zellen, nur die wt T-Zellen zu einem gewissen Anteil zu proliferieren begonnen haben (siehe 2.3). Dieser Befund könnte zwei grundlegende Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass die T-Zellen nicht in der Lage sind, in die S-Phase des Zellzyklus einzutreten und dass sie dadurch nicht expandieren können. Zum anderen wäre es möglich, dass die Gfi1-defizienten T-Zellen nach der Aktivierung das Apoptoseprogramm einleiten.

Die Analyse der Progression der T-Zellen im Zellzyklus zeigte, dass die Gfi1-defizienten T-Zellen hauptsächlich in der G1-Phase des Zellzyklus verbleiben und nicht in die S-Phase eintreten. Nach 48 Stunden Stimulation war der Effekt am deutlichsten und ist sowohl in den CD4⁺, als auch in den CD8⁺ T-Zellen zu finden (siehe 2.3.1). Eine weitere Bestätigung dieser Ergebnisse erbrachten CFSE Proliferationsexperimente, in denen der Verlauf der Zellteilungen verfolgt werden kann. Die wt T-Zellen ließen sich aktivieren und durchliefen im Durchschnitt vier bis fünf Zellteilungen in 72 Stunden. Die Gfi1-defizienten T-Zellen proliferierten nicht und nach 72 Stunden Stimulation waren nur noch sehr wenige lebende T-Zellen vorhanden (siehe 2.3.2). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den zuvor gefundenen Resultaten für die Jurkat T-Zellen, die Gfi1 überexprimierten. Diese Resultate legen nahe, dass der transkriptionelle Repressor Gfi1 die T-Zellteilung am Übergang zwischen G1- und S-Phase reguliert.

Um diese Hypothese auch *in vivo* zu überprüfen, wurden TCR transgene Mäuse verwendet, die nur einen bestimmten T-Zellrezeptor tragen und entweder CD4 (OT-II) oder CD8 (OT-I) restringiert waren. TCR OT-I/Gfi^{+/+} und TCR OT-I/Gfi^{-/-} T-Zellen bzw. TCR OT-II/Gfi^{+/+} und TCR OT-II/Gfi^{-/-} T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und in Ova-Peptid stimulierte wt

Mäuse transplantiert. Die *in vivo* Daten der CD4 restringierten T-Zellen bestätigten den zuvor gefundenen Proliferationsblock der *in vitro* stimulierten T-Zellen. Wildtyp OT-II TCR-transgene T-Zellen teilten sich nach Ova-Peptid-Stimulation aber Kontrollzellen, die in eine mit PBS injizierte Maus transplantiert wurden, teilten sich nicht. Im Gegensatz dazu fand keine Proliferation der Gfi1-defizienten CD4⁺ T-Zellen statt (siehe 2.3.2.2). Auch die Injektion von OT-II spezifischem Ova-Peptid in TCR OT-II/Gfi1^{-/-} Mäuse zeigte, dass die CD4⁺ Gfi1^{-/-} T-Zellen nur in sehr geringem Maße aktiviert wurden. Für die CD8⁺ T-Zellen konnte dies allerdings nicht bestätigt werden. OT-I/Gfi1^{-/-} CD8⁺ T-Zellen verhielten sich wie OT-I/Gfi1^{+/+} CD8⁺ T-Zellen und antworteten mit deutlicher Proliferation auf das Ova-Peptid. Dieses Ergebnis offenbarte einen erheblichen Unterschied im Verhalten von Gfi1^{-/-} CD8⁺ T-Zellen *in vivo* und *in vitro*. Möglicherweise fehlen den CD8⁺ T-Zellen in der Kultur spezifische Wachstumsfaktoren oder bestimmte Zytokine, die *in vivo* vorhanden sind. Eine andere Möglichkeit wäre ein Fehlen von Zell-Zell Kontakten, die weitere, *in vitro* nicht vorhandene, kostimulatorische Signale vermitteln.

Eine *in vitro* Stimulation dieser TCR restringierten OT-I und OT-II T-Zellen mit den spezifischen Peptiden könnte Aufschluss darüber geben, ob hier ein Unterschied zwischen der reinen TCR Komplex Stimulation durch α CD3 Antikörper und der Antigenstimulation des TCR durch die Ova-Peptide besteht. Weiterhin müßte überprüft werden, ob die Injektion von α CD3 Antikörper in TCR transgene Mäuse, die zusätzlich Gfi1 defizient sind, dieselben Resultate liefert, wie die Peptid Injektion. Zusammenfassend kann aus den durchgeführten Experimenten geschlossen werden, dass Gfi1 essentiell für die Proliferationsantwort der CD4⁺ T-Zellen ist und zu gewissen Maße das Proliferationsverhalten der CD8⁺ T-Zellen in der Zellkultur beeinflusst.

3.4 Die Rolle von Gfi1 während des aktivierungs-induzierten Zelltods

In den zuvor durchgeführten Proliferations-Untersuchungen der Gfi1-defizienten T-Zellen fiel auf, dass spätestens 48 Stunden nach α CD3+ α CD28 Stimulation nur noch ein geringer Anteil der Gfi1^{-/-} T-Zellen, verglichen mit den wt T-Zellen, AnnexinV negativ war und keine Apoptose induziert hatte. Die zu analysierende gesamt T-Zellanzahl, sowohl für die Propidium-Iodid Färbung, als auch für die CFSE Färbung, war deutlich geringer in Gfi1-

defizienten Mäusen als in wt Kontrollen (siehe 2.3.1 und 2.3.2.1). Würde ein reiner Proliferationsdefekt dieser Zellen vorliegen, so würde man erwarten, dass nach der TCR-Stimulation T-Zellen vorhanden sind, die einen naiven Phänotyp hinsichtlich ihrer Zellgröße und Granularität besitzen. Zellen also, die nicht ausreichend aktiviert wurden und nicht in die S-Phase übergegangen sind. Die FSC/SSC Analyse der T-Zellen im Durchflusszytometer zeigte jedoch, dass genau jene Gfi1^{-/-} T-Zellen nicht mehr vorhanden sind. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Apoptose Untersuchungen an Gfi1-defizienten T-Zellen durchgeführt, die Aufschluss darüber geben sollten, ob durch die Stimulation des TCR der programmierte Zelltod in den T-Zellen ausgelöst wird.

Die Messungen der Anteile lebender Zellen erfolgte durch AnnexinV Färbung und Analyse im Durchflusszytometer. AnnexinV bindet an Phosphatidylserin (PS), dass sich bei apoptotischen Zellen auf der Oberfläche befindet (Martin *et al.*, 1995; Castedo *et al.*, 1996; Bratton *et al.*, 1997). Bei lebenden Zellen liegt es auf der inneren Seite der Zellmembran, so dass lebende Zellen AnnexinV negativ sind. Für die vorherigen Proliferations-Untersuchungen wurde den T-Zellen zusätzlich das kostimulatorische Signal durch den α CD28 Antikörper geboten, das anti-apoptotisch wirkt. Unter denselben Stimulationsbedingungen wurde auch der Zelltod in den T-Zellen untersucht. Nach 48 Stunden der α CD3+ α CD28 Stimulation ist der Hauptanteil der Gfi1-defizienten T-Zellen und nur ein relativ geringer Teil der wt T-Zellen AnnexinV positiv. Da vor der Stimulation kein Unterschied in der Anzahl der apoptotischen Zellen zwischen Gfi1^{-/-} und wt T-Zellen bestand, konnte eindeutig gezeigt werden, dass durch die Stimulation des T-Zellrezeptors das Apoptoseprogramm in den Zellen ausgelöst wurde (siehe 2.4.1). Aktivierte T-Zellen, die eine Restimulation des T-Zellrezeptors erfahren, leiten zu gewissen Teilen den Zelltod ein (Yu *et al.*, 1996; Carpenter *et al.*, 2000; Yu und Anasetti, 2000). Um den α CD3 induzierten Zelltod zu untersuchen, wurden die T-Zellen zuerst mit α CD3 Antikörper stimuliert und anschließend erfolgte eine Restimulation wiederum mit α CD3 Antikörper. Die CD3 induzierte Apoptose in den Gfi1^{-/-} T-Zellen war deutlich gegenüber wt Kontrollen erhöht. Ebenso reichte eine 24-stündige Vorstimulation mit α CD3 Antikörper aus, das Apoptoseprogramm in den Gfi1^{-/-} T-Zellen einzuleiten, unabhängig von einer zweiten Stimulation des T-Zellrezeptors. Dies bestätigte die Ergebnisse der α CD3+ α CD28 Stimulation, bei der ebenfalls durch die alleinige TCR-Stimulation der Zelltod in den Gfi1^{-/-} T-Zellen ausgelöst wurde. Die Aktivierung der T-Zellen führte zur Erhöhung der Expression des CD95-Rezeptors und des CD95-Liganden auf der Zelloberfläche. Durch die Stimulation des CD95-Rezeptors, mittels α CD95 Antikörper,

kann so gezielt Apoptose in den T-Zellen ausgelöst werden. Allerdings ist für eine effektive CD95-Stimulation eine längere Präaktivierung der Zellen nötig, die in diesem Fall nicht durchgeführt werden konnte, da die Gfi1^{-/-} T-Zellen schon durch die α CD3 Stimulation apoptotisch wurden. Interessanterweise zeigte die Analyse von frisch isolierten Gfi1^{-/-} Milzzellen eine verstärkte CD95 Expression auf der T-Zelloberfläche. Es wurde daher die CD95R induzierte Apoptose, die ohne eine Vorstimulation ausgelöst werden kann, in diesen Zellen untersucht. In den wt T-Zellen konnte durch die alleinige CD95-Stimulation keine vermehrte Apoptose induziert werden. Allerdings war dies in Gfi1^{-/-} T-Zellen, aufgrund der vermehrt vorhandenen CD95-Rezeptoren, möglich.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Transkriptionsfaktor Gfi1 eine entscheidende Rolle beim Überlebensprozess von T-Zellen, nach Antigenstimulation spielt. Gfi1 beeinflusst also die α CD3 induzierte Apoptose. Ohne Stimulation des T-Zellrezeptors verhalten sich Gfi1^{-/-} T-Zellen genauso wie die wt Kontrollzellen und unterliegen keinem vermehrten, spontanen Zellsterben. Dadurch, dass der Zelltod in den Gfi1-defizienten T-Zellen sehr rasch nach TCR-Stimulation ausgelöst wird, handelt es sich wahrscheinlich um relativ frühe Prozesse der T-Zellrezeptor Signalkaskade, in der Gfi1 als Transkriptionsfaktor agiert. Es ist wahrscheinlich eine Funktion von Gfi1, die es in der späten G1-Phase beim Übergang in die S-Phase des Zellzyklus einnimmt. Insgesamt bestätigen die Analysen die zuvor durchgeführten Untersuchungen von Jurkat Zellen, die den Transkriptionsfaktor überexprimieren. Dort inhibierte Gfi1 den aktivierungs-induzierten Zelltod der T-Zellen (Karsunky *et al.*, 2002).

3.5 Gfi1 ist in die biologischen Prozesse der Zellaktivierung und des Zelltods involviert

Die zuvor durchgeführten Apoptosemessungen deuteten auf eine sehr frühe Rolle des Transkriptionsfaktors Gfi1 während der T-Zellaktivierung hin. Es war daher interessant zu ermitteln, welche Gene zu bestimmten Zeiten der T-Zellaktivierung in Gfi1-defizienten Zellen unterschiedlich gegenüber wt exprimiert werden. Um dies zu untersuchen wurden aufgereinigte T-Zellen von wt und Gfi1-defizienten Mäusen mit α CD3+ α CD28 Antikörper stimuliert und nach 0, 4, 8 und 24 Stunden RNA aus diesen Zellen isoliert. Die RNAs wurden weiter verarbeitet und auf DNA-Arrays hybridisiert. Es zeigte sich, dass über die vier

verschiedenen Zeitpunkte mehr als 3000 Gene in wt und Gfi1^{-/-} T-Zellen unterschiedlich reguliert waren. Die für die Analyse verwendete Software „Spotfire“ ermittelte für 2394 Gene eine Zuordnung (Annotation) zu bestimmten biologischen Prozessen (siehe 2.5.1). Mit Hilfe der „hypergeometrischen Verteilung“ überprüft der GO-Browser, ob bestimmte biologische Prozesse innerhalb der Ziel-Genliste signifikant angereichert sind im Vergleich zur Genliste des gesamten Arrays. Als signifikant angereichert wurden Prozesse betrachtet, die einen p-Wert < 0,001 aufwiesen. Unter den überrepräsentierten Prozessen fand sich die Zellaktivierung, die Zellverteidigungsantwort, die Zellproliferation, der Zelltod und die Antwort gegenüber einem Stimulus. All diese gefundenen Prozesse entsprachen den Erwartungen, da sich zuvor in den Untersuchungen zeigte, dass Gfi1 eine Rolle bei der T-Zellproliferation und bei der Apoptose spielt. Die Gene, die bei der Zellaktivierung und beim Zelltod eine Rolle spielten, wurden weiter im Detail betrachtet. Angereicherte Prozesse waren hier die „Lymphocytenaktivierung“ und die „Regulation der Lymphocytenaktivierung“. Im Prozess des Zelltods war besonders die „Tötung von Zellen“ und der „programmierte Zelltod“ stark angereichert. Auffällig war die statistische Häufung von Genen, die zur positiven Regulation der Apoptose gehören. Bei genauer Analyse der einzelnen Gene über die vier Zeitpunkte, zeigte sich, dass gegenüber den wt Kontrollen, der Hauptteil der Gene in Gfi1^{-/-} T-Zellen stärker exprimiert wird (siehe 2.5.2). Auch bei der genauen Betrachtung des Genexpressionsverlaufs aller 114 Gene des programmierten Zelltods, die hier gefunden wurden, weist der größte Anteil der Gene in den Gfi1^{-/-} T-Zellen verglichen mit wt Zellen eine stärkere Expression auf. Dies unterstützt die Rolle von Gfi1 als transkriptionelles Repressorprotein. Unter diesen hochregulierten Genen befinden sich putative Zielgene, die durch Gfi1 direkt reguliert werden könnten. Um jedoch direkte Zielgene von indirekten zu unterscheiden, müssten Promotor-Studien für jedes dieser einzelnen Gene durchgeführt werden, bei denen nach potentiellen Gfi1 Bindestellen gesucht werden müsste. Zusätzlich müsste für jede dieser Bindestellen eine Verifikation durch Chromatin Präzipitationsexperimente erfolgen.

Bei der Betrachtung des biologischen Prozesses der Lymphocytenaktivierung fiel auf, dass hier ca. 70% der Gene in Gfi1^{-/-} T-Zellen verglichen mit den wt Kontrollzellen, eine geringere Expression zeigen. Bei diesen Genen muss es sich um indirekte Zielgene von Gfi1 handeln, die nicht direkt reguliert werden. Gfi1 könnte die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren hemmen, die ihrerseits eine Repressoraktivität gegenüber den gefundenen Genen besitzen. Inwieweit die einzelnen Gene miteinander in Verbindung stehen,

ist allerdings, aufgrund der enormen Komplexität der hier untersuchten biologischen Prozesse, nicht nachzuvollziehen.

Einige interessante Gene der Lymphocytenaktivierung und der Apoptose wurden ausgewählt und ihre Expressionsverläufe genauer betrachtet (siehe 2.5.3). Darunter befanden sich die proapoptotischen Gene Bad und Apaf1 (apoptosis protease activating factor 1), die bei der Aktivierung der Caspase 9 eine Rolle spielen und das Apoptosom mitbilden (Riedl *et al.*, 2005), der CD95-Rezeptor und der CD95-Ligand, sowie das anti-apoptotische Bcl-2. Apaf1 und Bad sind beide in den Gfi1^{-/-} T-Zellen stärker exprimiert, was den Befund unterstützt, dass Gfi1-defiziente T-Zellen sensibler für apoptotische Stimuli sind. Auch der CD95-Rezeptor und der Ligand waren nach 24 Stunden Stimulation verstärkt in den Gfi1^{-/-} T-Zellen vorhanden. Allerdings war der CD95-Rezeptor in unstimulierten T-Zellen nicht stärker exprimiert, was der Nachweis des Proteins auf der Zelloberfläche nicht widerspiegelte. Es konnte dort gezeigt werden, dass Gfi1-defiziente T-Zellen mehr CD95-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen. Es ist aber nicht ungewöhnlich, dass die RNA Menge nicht zwangsläufig auch das Proteinexpressionsniveau eines Gens widerspiegelt, da weitere Prozesse, wie Protein Prozessierung und Transport, hier eine Rolle spielen.

Für das pro-apoptotische Bad konnte gezeigt werden, dass es in der Lage ist, Bcl-2 zu binden und so die anti-apoptotische Funktion von Bcl-2 zu unterdrücken (Zha *et al.*, 1996). Erst nach Phosphorylierung von Bad entlässt es Bcl-2. Der DNA-Array zeigte, dass die Bcl-2 Expression in den Gfi1-defizienten T-Zellen relativ stark vermindert war. Besonders auffällig war dies nach 4 Stunden TCR-Stimulation, wo T-Zellen verstärkt apoptotisch werden. Zusätzlich zu den apoptotischen Genen war das Gen für den Cyclin abhängigen Kinase Inhibitor p21 in den Gfi1-defizienten T-Zellen stärker exprimiert, als in wt T-Zellen, was einen Proliferationsblock der T-Zellen nach TCR-Stimulation unterstützen würde. Ein weiteres Zellzyklus Protein ist cMyc, das ebenfalls in den Gfi1^{-/-} T-Zellen unterschiedlich gegenüber wt T-Zellen exprimiert wurde. Es handelt sich hierbei um ein Onkoprotein, das nach Aktivierung der Zellen streng reguliert wird. In ruhenden, nicht proliferierenden Zellen, ist es nur sehr niedrig exprimiert. Erst nach mitogener Stimulation wird seine Expression sehr schnell induziert (Dean *et al.*, 1986). Gfi1^{-/-} T-Zellen zeigten eine schwächere cMyc Expression zu allen gemessenen Zeitpunkten, die jedoch am stärksten nach 24 Stunden Stimulation ausgeprägt war. Diese Tatsache könnte für einen Myc-abhängigen Proliferationsdefekt der Gfi1^{-/-} T-Zellen sprechen.

Die T-Zell spezifischen Rezeptoren CD3 und CD28 waren beide in Gfi1^{-/-} T-Zellen schwächer exprimiert, als in wt T-Zellen. Da bei den vorherigen TCR-

Stimulationsexperimenten mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 aktiviert wurde, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Gfi1^{-/-} T-Zellen, im Vergleich zu wt T-Zellen, ein abgeschwächtes Stimulationssignal erhalten. Eine Folge könnte die beobachtete gestörte T-Zellproliferation sein. Allerdings konnte in FACS-Analysen gezeigt werden, dass zwischen wt und Gfi1^{-/-} kein Unterschied in der CD28 Menge auf der Zelloberfläche existierte. Auch die CD3 Menge auf der Zelloberfläche der Gfi1-defizienten T-Zellen war im Vergleich zu wildtypischen T-Zellen nur marginal reduziert.

Eines der am stärksten regulierten Gene, die hier genauer betrachtet werden, war das Interleukin 4 (IL-4) Gen. Es war nach 4 Stunden Antigenstimulation in Gfi1^{-/-} T-Zellen vierzigfach geringer exprimiert als in den wt T-Zellen und lag auch zu allen weiteren Zeitpunkten deutlich unter dem wildtypischen Expressionsniveau. IL-4 spielt eine entscheidende Rolle bei der Th2 Differenzierung und Proliferation. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Gfi1 die Th2 Proliferation unterstützt und die Apoptose dieser Zellen verhindert. Zusammen mit Gata3 ist Gfi1 in einen Mechanismus involviert, durch den IL-4 die Th2 Expansion zu steuern scheint (Zhu *et al.*, 2002). Gfi1-defiziente Th2 Zellen wären damit sensibler für apoptotische Stimuli und könnten nicht in derselben Art und Weise expandieren wie die wt T-Zellen. Ein weiteres Gen, das die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen beeinflusst, ist Gadd45b, welches in Gfi1-defizienten T-Zellen etwas schwächer als in wt Zellen exprimiert war. Es konnte gezeigt werden, dass Gadd45b^{-/-} T-Zellen einen gestörten Th1 Phänotyp zeigen (Lu *et al.*, 2004).

Weitere, durch Gfi1 regulierte Gene, waren IL-15, Pic3cg, Tgfb1, Notch1 und E2F1. IL-15 war in den Gfi1^{-/-} T-Zellen stärker als in wildtypischen Zellen exprimiert. Es ist ein wichtiges Zytokin, welches das Überleben und die Homöostase der CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen unterstützt und könnte unter anderem den Gedächtnis T-Zellphänotyp der Gfi1-defizienten Mäuse zum Teil erklären. Allerdings ist es nur sehr leicht in nicht aktivierten, ruhenden T-Zellen in der Expression erhöht.

Tgfb1 ist ein Protein, dass sowohl bei der Zellteilung, als auch bei der Apoptose eine Rolle spielt und war in unstimulierten Gfi1^{-/-} T-Zellen, gegenüber wt Kontrollzellen, leicht erhöht. Tgfb1 defiziente T-Zellen zeigen unter anderem eine erhöhte CD3 Expression, wobei Gfi1-defiziente T-Zellen, wie zuvor erwähnt, eine leicht verringerte CD3 Expression zeigten. Allerdings besitzen Tgfb1^{-/-} T-Zellen und nicht Tgfb1 überexprimierende Zellen einen Proliferationsdefekt und eine vermehrte Apoptoserate (Bommireddy *et al.*, 2003).

Die Transkriptionsfaktoren der E2F Familie steuern ebenso apoptotische, wie auch proliferative Prozesse in T-Zellen. E2F1 und E2F2 defiziente T-Zellen zeigen eine

beschleunigte T-Zellproliferation, entwickeln Tumore und Autoimmunität (Zhu *et al.*, 2001). In den unstimulierten Gfi1^{-/-} T-Zellen fand sich eine erhöhte E2F1 Expression, gegenüber wt T-Zellen, was dazu führen könnte, dass der Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus erschwert wird.

Notch1 ist ebenfalls eines der Proteine, welches in Gfi1-defizienten Zellen schwächer als in wt Zellen exprimiert wurde. Notch1 ist hauptsächlich als wichtiges Regulatorprotein der Lymphocyten Differenzierung bekannt, aber es spielt auch eine Rolle bei der Aktivierung reifer Lymphocyten (Adler *et al.*, 2003). Nach Antigenstimulation wird die Notch1 Expression gesteigert und führt zur verstärkten Proliferation der Zellen. Die Inhibierung des Proteins führt dagegen zu einer Verringerung der Zellteilung. Zusätzlich ist Notch1 in der Lage mit Pic3cg zu interagieren, welche in Überlebensprozesse der Thymocyten, sowie in Apoptose und Proliferation von T-Zellen, involviert ist (Sasaki *et al.*, 2000). Die Pic3cg Expression war in Gfi1-defizienten T-Zellen leicht erhöht, im Vergleich zu wt Zellen.

Einige der zuvor erwähnten Gene wurden auch von anderen Arbeitsgruppen als putative Zielgene von Gfi1 identifiziert. Zum Beispiel wurden in den IL-4, cMyc, Thy-1 und CD8 Promotoren Gfi1 Bindestellen gefunden (Zweidler-Mckay *et al.*, 1996) und in Chromatin Immunopräzipitationen konnte gezeigt werden, dass Gfi1 an die Promotoren von cMyc und E2F5 in Jurkat Zellen bindet (Duan und Horwitz, 2003).

Um die erhaltenen DNA-Array Daten zu verifizieren, wurden für die einzelnen zuvor betrachteten, unterschiedlich regulierten Gene zwei Real-Time PCRs und eine konventionelle RT-PCR mit drei unabhängigen Mauspaaren durchgeführt. In der RT-PCR konnten die zuvor im DNA-Array ermittelten Expressionsunterschiede zwischen wt und Gfi1^{-/-} T-Zellen von IL-4, CD3 und IL-15, bestätigt werden. Für die meisten der anderen Gene waren die Unterschiede unter diesen Bedingungen nicht so deutlich sichtbar und es gab auch zu einzelnen Zeitpunkten zum Teil Abweichungen zum DNA-Array. Eine Ursache hierfür könnte die relativ geringe Sensitivität sein, die eine „konventionelle“ RT-PCR bietet. Alle PCRs wurden bei einer Anzahl von 33 Zyklen durchgeführt. Je nach Expressionsstärke der einzelnen Gene könnte dies schon im Sättigungsbereich der Amplifikation liegen, was dazu führte, dass geringere Expressionsunterschiede visuell nicht mehr zu erkennen waren. Daher ist eine quantitative Aussage über die unterschiedlichen Genregulationen in diesem Fall nicht möglich. Aufgrund dieser Tatsache wurde für jedes der einzelnen Gene eine Real-Time PCR durchgeführt, die eine genaue Quantifizierung der unterschiedlichen Genregulationen ermöglichte. Für eine statistische Auswertung wurde für jedes Gen und für jeden Zeitpunkt

eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Zusätzlich wurden alle Real-Time PCRs mit einem zweiten, unabhängigen Mauspaar durchgeführt, um Variationen im Experiment ausschließen zu können. Für jede cDNA-Probe wurde eine Gapdh- und eine Sdhb-PCR, die zur Normierung der delta CT-Werte diente, durchgeführt. Da die verwendeten Gapdh-Primer über keine Exon-Intron Übergänge verlaufen, wurde zusätzlich die Succinatdehydrogenase, als „Housekeeping Gene“, für die Berechnung der delta CT-Werte verwendet. Die Sdhb-Primer überspannen Exon-Intron Übergänge. Die DNA-Array Analyse stellte sicher, dass die Sdhb nicht unterschiedlich in Gfi1^{-/-} T-Zellen gegenüber wt T-Zellen reguliert wurde. Einen Vorteil dieser Normierung gegenüber Gapdh bietet die reine Amplifikation auf cDNA-Ebene, so dass DNA-Kontaminationen, die trotz DNase-Verdau auftreten können, nicht die Expressionsdaten beeinflussen. Die Normierung auf Gapdh führte allerdings in diesem Fall zu keinen unterschiedlichen Genexpressionsverläufen, so dass eine DNA-Kontamination ausgeschlossen werden konnte.

Im Gegensatz zu der „konventionellen“ RT-PCR, konnten fast alle Genexpressionsunterschiede zwischen Gfi1^{-/-} und wt T-Zellen, die zuvor verlässlich im DNA-Array gemessen worden sind, bestätigt werden. Abweichungen zeigten sich zum Teil in der Stärke des Expressionsunterschiedes zwischen Real-Time PCR und DNA-Array. Ein Beispiel dafür ist die IL-4 Expression, die im DNA-Array nach 4 Stunden TCR-Stimulation in den Gfi1^{-/-} T-Zellen vierzigfach niedriger war, als die Expression in den wt T-Zellen. In der Realtime-PCR Analyse fand man einen achtfachen Expressionsunterschied zwischen wt und Gfi1^{-/-} T-Zellen nach 4 Stunden Stimulation. Eine mögliche Ursache könnten individuelle Unterschiede der Tiere sein, die zur einer Variation in der RNA-Menge der einzelnen Gene führte.

Für Tgfb1 konnte in keiner der durchgeführten Kontroll-PCRs eine stärkere Expression in den unstimulierten Gfi1^{-/-} T-Zellen gefunden werden, so dass man in diesem Fall davon ausgehen kann, dass Tgfb1 nicht zu den Genen gehört, deren Expression durch Gfi1 gesteuert wird.

Die Real-Time PCR des IL-7R bestätigte nicht nur die DNA-Array Daten, sondern auch FACS-Analysen an Gfi1 defizienten T-Zellen. Nach Antigenstimulation wurde sowohl in den Gfi1^{-/-} T-Zellen, als auch in den wt T-Zellen die IL-7R Expression schwächer. Dies war auf transkriptioneller Ebene, wie auch auf Proteinebene im FACS zu sehen. Nach 24 Stunden TCR-Stimulation wurde der IL-7R in den Gfi1^{-/-} T-Zellen stärker als auf wt T-Zellen exprimiert, was sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht auf der Zelloberfläche in der Proteinmenge widerspiegelte. Allerdings konnte in CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen eine erhöhte IL-7R-Menge auf der Zelloberfläche gefunden werden.

Insgesamt konnten die DNA-Array Daten und die zur Verifikation durchgeführten Real-Time PCRs der unterschiedlich regulierten Gene die zuvor gefundenen Ergebnisse unterstützen. Gfi1 ist ein transkriptioneller Repressor, der in eine Vielzahl verschiedener Prozesse der Zellaktivierung, Zellteilung und Apoptose involviert ist. In den stimulierten Gfi1^{-/-} T-Zellen findet eine Art Reprogrammierung des genetischen Programmes statt, was dazu führt, dass die Gfi1-defizienten T-Zellen einen Proliferationsdefekt aufweisen und verstärkt das Apoptoseprogramm einleiten.

3.6 Die Rolle von Gfi1 im Verlauf einer Friend Virusinfektion

3.6.1 Gfi1-defiziente C57Bl/6 Mäuse sind nicht resistent gegenüber einer Friend Virusinfektion

Das Friend Virus Modell bietet eine gute Möglichkeit, die T-Zellantwort, besonders die der CD8⁺ T-Zellen, *in vivo* zu untersuchen. In den zuvor durchgeführten Analysen wurden die T-Zellen entweder *in vitro* mit Antikörpern gegen den CD3 Korezeptor stimuliert oder *in vivo* durch Injektion bestimmter Ovalbumin-Peptide. Durch die Infektion der Gfi1^{-/-} Mäuse mit dem Friend Virus war es möglich, die Rolle von Gfi1 in der T-Zellantwort während einer „wirklichen“ Infektion zu untersuchen. Mäuse des C57Bl/6 Stammes sind normalerweise resistent gegenüber einer Friend Virusinfektion. Sie besitzen eine Mutation in einer bestimmten Tyrosinkinase, die für die Aktivierung des EpoR verantwortlich ist. Die Mäuse entwickeln daher keine Erythroleukämie und sind in der Lage die Virusinfektion zu bekämpfen (Dietz und Rick, 1972). In den durchgeführten Experimenten wurden Gfi1^{-/-} Mäuse und wt Mäuse, die sich beide im genetischen C57Bl/6 Hintergrund befanden, mit Friend Virus infiziert. Die Analyse der Zellen erfolgte zehn Tage bzw. in einem zweiten Experiment fünf Wochen nach FV Infektion. Schon nach zehntägiger Infektion war eine deutliche Vergrößerung der Gfi1^{-/-} Milzen zu sehen, die noch viel stärker nach fünf Wochen ausgeprägt war und die in den wt Mäusen nicht zu beobachten war. Es ist bekannt, dass die Infektion von nicht resistenten Mäusen, etwa Balb/c mit dem Friend Virus zu einer massiven Milz Vergrößerung führt. Dies lässt vermuten, dass der Verlust von Gfi1 dafür verantwortlich war, dass die Mäuse das Friend Virus nicht bekämpfen konnten. Die Untersuchungen des Blutes der Mäuse zeigte schon nach zehn Tagen (siehe 2.8.1) eine sehr hohe Viruslast. Zu

diesem Zeitpunkt fand sich nur noch eine geringe Menge des Virus spezifischen AK34 Antikörpers im Blut der wt Mäuse. Nach fünf Wochen ist die Viruslast in den wt Mäusen stark gesunken, im Gegensatz zu den $Gfi1^{-/-}$ Mäusen, in denen diese weiterhin angestiegen ist. Die Milzen der Mäuse zeigten eine sehr hohe Menge an Virus spezifischen $CD8^{+}$ T-Zellen, besonders fünf Wochen nach der Infektion. Die genauere Analyse der Zellen ergab in den $Gfi1^{-/-}$ Mäusen eine prozentual geringere B- und T-Zellanzahl in der Milz und in den Lymphknoten und ebenso prozentual weniger $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellen als in den wt Kontrollen. Die absoluten T-Zellzahlen lagen allerdings im selben Bereich wie die der wt Zellen. Eine Ausnahme bilden hier die $CD8^{+}$ T-Zellen, deren Gesamtmenge in $Gfi1^{-/-}$ Mäusen auch erhöht war. Das zeigte auch das veränderte prozentuale Verhältnis der $CD4^{+}$ zu $CD8^{+}$ T-Zellen in den $Gfi1$ -defizienten Mäusen, dass nunmehr fast gleich eins zu eins $CD4^{+}$ zu $CD8^{+}$ T-Zellen war (siehe 2.8.2). Die Ergebnisse zeigten, dass es in $Gfi1^{-/-}$ Mäusen zu einer massiven Expansion von Zellen kommt, die nicht der B- oder T-Zellreihe angehören, die die Ursache der extremen Milzvergrößerung waren.

3.6.2 $Gfi1$ -defiziente $CD8^{+}$ T-Zellen besitzen eine nicht eingeschränkte Effektorfunktion

Die nähere Analyse der $CD8^{+}$ T-Zellen mit Antikörpern gegen den Aktivierungsmarker CD43 und mit Virus spezifischen Tetrameren fünf Wochen nach der FV Infektion, ergab eine besonders hohe Menge an $CD8^{+}$ Virus spezifischen T-Zellen in $Gfi1^{-/-}$ Mäusen. Trotz der großen Menge an $CD8^{+}$ Effektorzellen sind die $Gfi1^{-/-}$ Mäuse nicht in der Lage, die Infektion zu kontrollieren. Mögliche Ursache dafür könnte eine verzögerte oder ineffiziente T-Zellantwort sein. Gerade in der frühen Phase der Infektion ist die Entwicklung einer schnellen, wirkungsvollen T-Zell Effektorantwort besonders wichtig. Ob ein kinetischer Defekt, d.h. eine Verzögerung der T-Zellantwort, die Ursache für das Verhalten der $Gfi1$ -defizienten Mäuse ist, wurde durch eine weitere, kürzere Infektion (10 Tage) untersucht. Innerhalb dieses Zeitraumes beginnt die Entwicklung der Effektorantwort und die erste Expansion der Virus spezifischen $CD8^{+}$ T-Zellen findet statt. Aber auch schon nach dieser kurzen Zeit besitzen $Gfi1$ -defiziente Mäuse, im Vergleich zu den wt Mäusen, eine höhere Anzahl an Virus spezifischen $CD8^{+}/tet^{+}$ T-Zellen. Die Immunantwort entwickelt sich also in $Gfi1^{-/-}$ Mäusen schnell genug. Daher war es naheliegend, die Funktionsfähigkeit dieser Virus spezifischen T-Zellen zu untersuchen und zu bestimmen, wie sich deren Effektorfunktionen

verhalten. Um festzustellen, in welchem Aktivierungszustand sich die Zellen befinden, wurden diese mit dem Antikörper gegen das glykolysierte CD43 Protein gefärbt, dass nur auf aktivierten Zellen zu finden ist. Es stellte sich heraus, dass in den Gfi1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den wt Kontrollmäusen, fast dreimal so viele aktivierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen existieren. Die weitere Analyse der aktivierten CD8⁺ T-Zellen zeigte, dass diese vermehrt Granzym B herstellen, was für eine verstärkte Effektorfunktion spricht. Ebenso wurde die Produktion von unterschiedlichen Zytokinen bestimmt, um einen Defekt der T-Zellen ausschließen zu können. Die Intrazellulärfärbung von IFN γ , TNF α und IL-2 in den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ergab eine deutlich erhöhte IFN γ und IL-2 Produktion in den CD8⁺ Gfi1^{-/-} T-Zellen (siehe 2.8.4), wobei die TNF α Menge unverändert gegenüber den wt Zellen blieb. In den CD4⁺ T-Zellen fanden sich zwischen den wt und Gfi1^{-/-} Mäusen keine großen Unterschiede in der Zytokinproduktion. Eine Erklärung für die erhöhte IL-2 und IFN γ Menge in den Gfi1^{-/-} Mäusen könnte die größere Anzahl an Effektorzellen sein, die in den Gfi1^{-/-} Mäusen vorhanden ist und zu einer vermehrten Produktion von Zytokinen führt. Allerdings zeigte die Untersuchung der aktivierten Virus spezifischen T-Zellen ebenso eine massive Steigerung der Interferon γ Produktion. Gfi1 beeinflusst demnach nicht nur die Menge der vorhandenen Effektorzellen, sondern auch die Zytokinproduktion pro Zelle. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann ein Defekt der CD8⁺ T-Zellen in Gfi1^{-/-} Mäusen ausgeschlossen werden. Sie waren in ausreichendem Maße vorhanden, produzierten Granzym B und die für die Virenabwehr nötigen Zytokine und waren dennoch nicht in der Lage, die Virusinfektion zu bekämpfen. Die zuvor durchgeführten *in vivo* Proliferationsversuche mit CD8⁺ T-Zellen zeigten, dass im Gegensatz zu den CD4⁺ T-Zellen, die CD8⁺ T-Zellen in der Lage sind, nach Antigenstimulation zu expandieren. In sofern bestätigen die Befunde der Friend Virusinfektion die Ergebnisse der Proliferations-Untersuchungen der TCR restringierten Mäuse. Gfi1^{-/-} T-Zellen weisen also keinen spezifischen funktionellen Defekt auf. Ihre erhöhte Zahl könnte auf einen Sekundäreffekt zurückzuführen sein, der mit der in Gfi1^{-/-} Tieren stark erhöhten Viruslast in Zusammenhang stehen könnte. Die Virusmenge war in Gfi1^{-/-} Mäusen so hoch, dass sie durch die CD8⁺ Effektorzellen nicht kontrolliert werden konnte, obwohl diese Zellen voll funktionsfähig waren. Es stellt sich nun die Frage, wodurch es zu dieser massiven Viruslast kommt und ob es sich bei den Gfi1^{-/-} Mäusen um eine sich entwickelnde Erythroleukämie handelte. Die FSC/SSC Analyse der Milzzellen im Durchflusszytometer zeigte, dass sich die expandierende Zellpopulation an derselben Stelle befindet, wie die monocytären Zellen, die in Gfi1^{-/-} Milzen auch ohne Infektion vermehrt vorhanden war. Das Friend Virus benutzt neben den erythroiden Vorläuferzellen vornehmlich

aktivierte, sich teilende Zellen. Erste Untersuchungen der Viruslast in verschiedenen Zelltypen der wt und Gfi1-defizienten Mäuse ergaben eine vermehrte Virusmenge in B-Zellen und monocytären Zellen in den Gfi1^{-/-} Mäusen. In Gfi1^{-/-} Ter119⁺ Zellen der erythroiden Reihe fand sich keine erhöhte Virusmenge. Allerdings zeigte sich schon nach einer zehntägigen Infektion eine Expansion der Ter119⁺ erythroiden Zellen, so dass die Ausbildung einer Erythroleukämie nicht ausgeschlossen werden kann. Auch wenn die Viruslast pro Ter119⁺ Zelle nicht erhöht war, ist dadurch dennoch die Gesamtvirusmenge durch die Expansion dieser erythroiden Zellen höher als in den wt Mäusen. Eine weitere Ursache für die gesteigerte Virusmenge in den Gfi1-defizienten Mäusen könnte die größere Menge an monocytären Zellen sein, die dem Virus als Vermehrungsquelle dienen können. Um herauszufinden, ob es sich um eine Leukämie handelt und welcher Art diese Leukämie ist, müssten noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Zum einen müssten die Mäuse noch einmal infiziert werden, wobei für die nachfolgende Analyse länger als fünf Wochen gewartet werden sollte, um vollständig transformierte Zellen zu finden. Die expandierenden Zellen müssten daraufhin isoliert und die Zellart bestimmt werden. Weiterhin müsste überprüft werden, ob diese Zellen, wenn sie in einen gesunden Wirt transplantiert werden, wiederum eine Erythroleukämie bilden können.

3.6.3 Die Bildung von Gedächtnis T-Zellen in Friend Virus infizierten Gfi1-defizienten Mäusen

In nicht infizierten Gfi1^{-/-} Mäusen konnte gezeigt werden, dass Gfi1 die Größe der Gedächtnis T-Zellpopulationen beeinflusst. Sowohl die CD4⁺ und CD8⁺ zentralen Gedächtniszellen, als auch die Effektor Gedächtniszellen waren in den Gfi1-defizienten Mäusen in größerer Zahl als in wt Mäusen vorhanden. Nach der Friend Virusinfektion fand man ebenso mehr Gedächtnis T-Zellen in Gfi1^{-/-} Mäusen, im Vergleich zu den wt Kontrollen. Der prozentuale Anteil an Gedächtnis T-Zellen, besonders innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulation, war sowohl bei den wt Mäusen, als auch bei den Gfi1^{-/-} Mäusen angestiegen, was nach einer akuten Infektion zu erwarten ist. Allerdings waren bei den Gfi1^{-/-} Mäusen fast keine naiven T-Zellen mehr vorhanden, sondern fast nur Effektor und Gedächtniszellen. Ursache dafür war höchstwahrscheinlich die hohe Viruslast, die dazu führte, dass die T-Zellen ständig einen Stimulus erhielten. Inwiefern es sich um einen Sekundäreffekt der erhöhten Virusmenge handelte oder um einen Gfi1 spezifischen Effekt, sollte durch eine weitere Infektion von nicht

resistenten Mäusen erfolgen, die eine ähnliche Viruslast aufweisen, wie die $Gfi1^{-/-}$ Mäuse. Eine Analyse der Gedächtnis T-Zellen dieser Mäuse kann Aufschluss darüber geben, in welchen Raten sich die Gedächtnis T-Zellen neu bilden. In weiteren Versuchen ist geplant, die Menge an Virus spezifischen Gedächtnis T-Zellen zu untersuchen, um detailliertere Einblicke in den Mechanismus zu erhalten, durch den der Transkriptionsfaktor $Gfi1$ aktiv die Bildung des immunologischen Gedächtnisses beeinflusst.

Zusätzlich zu den Gedächtnis T-Zellpopulationen wurde auch die Art und Weise untersucht, wie die $\gamma\delta$ T-Zellen der $Gfi1^{-/-}$ Mäuse auf die Friend Virusinfektion reagieren. Die zuvor gefundenen $CD3^{+}CD4^{-}CD8^{-}$ $\gamma\delta$ T-Zellen hatten sich in der Menge gegenüber nicht infizierten Mäusen nicht verändert. Allerdings fiel bei der Analyse der $CD4^{+}$ T-Zellen eine zusätzliche $CD4^{+}$ T-Zellpopulation auf, die den $CD4$ Korezeptor in einer geringeren Menge auf der Oberfläche trug, als die eigentlichen $CD4^{+}$ T-Zellen. Die nähere Betrachtung dieser Zellen zeigte, dass es sich hierbei um $\gamma\delta$ T-Zellen handelte (siehe 2.8.5). Ungewöhnlich war das Vorhandensein des $CD4$ Korezeptors auf der Zelloberfläche. In der Literatur konnte keine Beschreibung derartiger Zellen gefunden werden, so dass die Funktion der Zellen unbekannt ist. Es könnte sich hierbei um dieselbe $\gamma\delta$ T-Zellpopulation handeln, die auch schon vor der Infektion in den $Gfi1^{-/-}$ Mäusen vorhanden war und die aufgrund der Virusinfektion aus einem unbekannten Grund begonnen hat, den $CD4$ Korezeptor zu exprimieren. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob in anderen, nicht resistenten Mäusen, eine derartige Population zu finden ist.

Durch die Friend Virusinfektion der $Gfi1$ -defizienten Mäuse konnte gezeigt werden, dass $Gfi1$ eine wichtige regulatorische Funktion innerhalb der Virus spezifischen Immunantwort besitzt. Der Verlust des Proteins führte zu einem dramatischen Verlauf der Virusinfektion. Allerdings war die T-Zellantwort, zumindest die der $CD8^{+}$ T-Zellen, nicht die Ursache der gescheiterten Virusbeseitigung. Da ebenso die $CD4^{+}$ T-Zellen eine wichtige Funktion in der Virusantwort besitzen, wäre eine genauere Analyse der $CD4^{+}$ T-Zellen, die in den $Gfi1^{-/-}$ Mäusen nach der Infektion in viel geringeren Mengen vorhanden waren, aufschlussreich.

4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des Zinkfinger Transkriptionsfaktors Gfi1 in peripheren T-Zellen untersucht. Die Analyse von Gfi1-defizienten T-Zellen ermöglichte eine Charakterisierung der unterschiedlichen Prozesse, in die Gfi1 involviert ist. Es konnte gezeigt werden, dass Gfi1 die Zusammensetzung der unterschiedlichen T-Zellpopulationen in den peripheren lymphatischen Organen, wie der Milz und den zervikalen Lymphknoten, beeinflusst. Insgesamt besaßen Gfi1-defiziente Mäuse weniger T-Zellen, wobei es zu einer Verschiebung des prozentualen Verhältnisses der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen kam. Gfi1^{-/-} Mäuse besaßen prozentual deutlich mehr CD8⁺ T-Zellen.

Eine weitere Funktion übernimmt Gfi1 bei der Ausbildung und beim Erhalt des immunologischen Gedächtnisses. Gfi1^{-/-} Mäuse besaßen mehr zentrale und mehr Effektor Gedächtnis T-Zellen, die sich zusätzlich hinsichtlich der IL-7R Expression unterschieden. Ebenso bildeten sich nach einer Friend Virus Infektion erheblich mehr Gedächtnis T-Zellen in den Gfi1-defizienten Mäusen.

Aber nicht nur die Differenzierung der T-Zellen in bestimmte Richtungen, sondern auch die T-Zellantwort nach Antigenstimulation wurde von Gfi1 beeinflusst. Gfi1 ist ein Transkriptionsfaktor der für die Proliferation der T-Zellen nötig ist. Der Verlust des Proteins führte zu einer gestörten Zellzyklusprogression nach Antigenstimulation, wobei Gfi1^{-/-} T-Zellen nicht in der Lage waren in die S-Phase einzutreten. Es konnte gezeigt werden, dass die TCR-Stimulation der Gfi1-defizienten T-Zellen zu einer verstärkten Induktion des programmierten Zelltods führte. Gfi1 lieferte den aktivierten T-Zellen ein wichtiges Überlebenssignal. Allerdings übernahm Gfi1 in den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eine unterschiedliche Rolle, da *in vivo* Stimulationsexperimente mit Ovalbuminpeptiden und die Friend Virus Infektion der Gfi1-defizienten Mäuse zeigte, dass Gfi1^{-/-} CD8⁺ T-Zellen in der Lage waren, auf den jeweiligen Antigenstimulus zu reagieren.

Durch die Infektionsexperimente mit dem Friend Virus war eine Analyse der Gfi1 abhängigen T-Zellantwort während einer „wirklichen“ Infektion möglich. Hier zeigte sich, dass der Transkriptionsfaktor Gfi1 für eine erfolgreiche Virusbeseitigung nötig war aber nicht für die Aufrechterhaltung von CD8 Effektorfunktionen. Resistente C57Bl/6 Mäuse, denen Gfi1 fehlt waren nicht mehr in der Lage, die Virusinfektion zu kontrollieren. Ursache dafür war nicht die Effektorantwort der CD8⁺ T-Zellen, die in den Gfi1^{-/-} Mäusen normal verlief, sondern höchstwahrscheinlich die vermehrt vorkommenden Monocyten, die dem Virus als Vermehrungsquelle dienten.

Die Untersuchungen der Genexpressionsprofile mittels DNA-Array und Real-Time PCR von unstimulierten und unterschiedlich lang stimulierten T-Zellen der wt und Gfi1 defizienten T-Mäuse zeigte, dass Gfi1 ein Transkriptionsfaktor ist, der in unterschiedliche Prozesse der Lymphocyten Aktivierung, T-Zellproliferation und Apoptose involviert ist.

Für das Evi5 Protein wurde in der vorliegenden Arbeit eine Knock Out Maus generiert. Sowohl auf DNA-, als auch auf RNA-Ebene konnte die Rekombination des Nullallels nachgewiesen werden. Die Analysen hämatopoetischer und lymphoider Zellen aus Evi5^{-/-} Mäusen, die noch die Neomycinresistenz enthielten, zeigten gegenüber wt Zellen keinen veränderten Phänotyp und wurden daher nicht genauer untersucht.

5 Material und Methoden

Die nachfolgenden Protokolle sind, wenn nicht anderweitig vermerkt, der Methodensammlung von Sambrook *et al.*, 1989, sowie Current Protocols in Immunology entnommen.

5.1 Statistische Auswertungen

Um die Signifikanz der erhaltenen Messwerte der FACS-Analysen zu bestimmen, wurde mit Hilfe der Excel-Software ein „Student's T-Test“ durchgeführt. Die so ermittelten p-Werte wurden in den einzelnen Abbildung mit angegeben. Bei allen gezeigten Analysen wurde ein „gepaarter“ T-Test durchgeführt, bei dem jeweils die Messwerte einer wt Maus mit denen der zugehörigen, genetisch veränderten Geschwistermaus, verglichen wurden. In allen Analysen der FV infizierten Mäuse wurde ein „ungepaarter“ T-Test durchgeführt, da in diesem Fall alle Mäuse zur selben Zeit analysiert wurden und jeweils alle untereinander verglichen werden können.

5.2 Chemikalien, Enzyme, Lösungen

Soweit nicht anders angegeben beziehen sich die Prozentangaben bei Flüssigkeiten auf v/v und bei Feststoffen auf w/v.

5.2.1 Häufig verwendete Lösungen

Acrylamidlösung:	38% Acrylamid
	2% N,N'-Methylenbisacrylamid
100x Denhardts:	2% Ficoll 400
	2% BSA
	2% Polyvinylpyrrolidon
Ethidiumbromidlösung:	10 mg/ml Ethidiumbromid in TE

50x MOPS:	1 M MOPS 250 mM Natriumacetat 5 mM EDTA
PBS	137 mM NaCl 2,6 mM KCL 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
4x SDS-Probenpuffer	62 mM Tris-HCl, pH 6,8 2% SDS 10% Glycerin 5% β-Mercaptoethanol 0,025 % Bromphenolblau
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
TAE	40 mM Tris-Acetate, pH 7,8 2 mM EDTA
TBE	90 mM Tris-Acetate, pH 7,8 10 mM Borsäure 1 mM EDTA
TE	10 mM Tris-HCl, pH 7,9 1 mM EDTA
WCE-Puffer	50 mM Hepes 20 mM NaF 450 mM NaCl 0,2 mM EDTA 1% Nonidet-P40 25% Glycerol

6xDNA-Puffer	50 %	Glycerol
	0,02%	Bromphenolblau
	0,04%	Xylencyanol
	1 mM	EDTA
Ampicillin (1000x)	80 mg/ml	
Kanamycin (1000x)	25 mg/ml	
LB-Medium	10 g/l	NaCl
	10 g/l	Caseinhydrolysat
	5 g/l	Hefe-Extrakt
	pH 7,2 mit NaOH einstellen	
LB-Agar	15 g/	Bacto-Agar in LB-Medium

5.2.2 Verwendete Größenmarker

DNA-Größenmarker	1 kb DNA-Leitermarker; Fa. Genecraft
	100 bp DNA-Leitermarker
	λ DNA-Marker
Protein-Größenmarker	Vorgefärbter SDS-Page Standard (Broad Range), Fa. NEB „Rainbow“ Marker (Fa. Amersham)

5.2.3 Verwendete Antikörper

Durchflusszytometrie

(Anti-Maus Antikörper, Becton-Dickinson (BD) und Caltag)

Bezeichnung	Markierung	Subtyp
CD3	Biotin, APC	Hamster IgG
CD4	Biotin, PE, APC, PerCP-Cy5.5	Ratte IgG2a
CD8 α	Biotin, FITC, APC, PerCP-Cy5.5	Ratte IgG2a
CD25 (IL-2R α)	FITC, PE, APC	Ratte IgG1
CD44	FITC, APC, PE	Ratte IgG2b

CD43 (glykosyliert)	FITC	Ratte IgG2a
CD62L	APC	Ratte IgG2a
CD69	FITC, PE	Ratte IgG1
CD45R (B220)	Biotin, PE, APC	Ratte IgG2a
CD90 (Thy1.2)	APC	Maus IgG2b
α -TCR β	PE, APC	Hamster IgG
CD16/CD32 (Fc γ III/II)	Fc γ -Block	Ratte IgG2b
CD45RB	PE	Ratte IgG2a κ
CD122 (IL-2 und IL-15R β)	PE	Ratte IgG2a
V α 2 (B20.1)	Biotin	Ratte IgG2a λ
NK1.1	Biotin	Maus IgG2a κ
TCR $\gamma\delta$	PE	Amenian hamster IgG2a
IL-2	APC	Ratte IgG2b
IFN γ	APC	Ratte IgG1
TNF α	APC	Ratte IgG1
Streptavidin-Konjugate Antikörper.	FITC, PE, APC, PerCP-Cy5.5 gegen biotinylierte FACS-	

Immunoblot Verfahren

Bezeichnung	Beschreibung/Verwendung	Herkunft
Anti-Flag	M2 monoklonaler Maus-Antikörper	Stratagene
Gfi1	polyklonales Kaninchen Serum (IgG) gegen murines Gfi1 Protein	Schmidt et al., 1998
Anti-Kaninchen	Peroxidase - gekoppelter Sekundär- antikörper gegen primäre Kaninchen Antikörper des Typs IgG	Fa. Dianova
Anti-Maus	Peroxidase - gekoppelter Sekundär-	

	antikörper gegen primäre monoklonale Maus-Antikörper des Typs IgG	Fa. Dianova
Anti-Ziege	Peroxidase - gekoppelter Sekundär- antikörper gegen primäre monoklonale Ziegen-Antikörper des Typs IgG	Fa.Dianova

5.3 Organismen

5.3.1 Verwendeter Bakterienstamm

DH5 α : *supE44*, *hsdR17*, *recA*, Δ *lacU169*, (ϕ 80*lacZ* Δ M15), *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*

Langsam wachsender *recA*⁻ Stamm, der sich für die Transformation und die Vermehrung von Plasmiden eignet.

5.3.2 Verwendeter Maustamm

Für Verpaarungen wurden C57Bl/6 Mäuse verwendet. Alle untersuchten gendefizienten und transgenen Tiere befanden sich im genetischen C57Bl/6 Hintergrund.

5.4 Molekularbiologische Methoden

5.4.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien

Die folgenden Arbeitsschritte werden alle auf Eis durchgeführt. 200 ml LB-Medium werden in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit 2 ml einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Suspension wird dann in vier 50 ml Falcon Röhrchen überführt und bei 2000-3000 upm pelletiert. Anschließend werden die Pellets in jeweils 5 ml kalter 0,1 M CaCl₂ Lösung vorsichtig resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Danach wird die Bakterien Suspension bei 2000-3000 upm sedimentiert und die Pellets in jeweils 2 ml 0,1 M CaCl₂ Lösung aufgenommen und vereinigt. Daraufhin folgt eine weitere 30 minütige Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von Glycerin auf 20 % werden die

Zellen aliquotiert und auf trocken Eis Schock gefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgt bei -80°C .

5.4.2 Transformation Hitze-Schock kompetenter Bakterien

Für die Transformation werden je 100 μl tiefgefrorene kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt (0,1-10 ng) und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden werden die Zellen sofort wieder auf das Eis transferiert. Zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz werden die Zellen in 900 μl LB-Medium 60 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert und dann auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen, je nach transformiertem Plasmid, ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

5.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt. Dazu werden die Nukleinsäuren 1:250 in Wasser verdünnt. Dabei entsprechen:

1 OD₂₆₀ = 50 μg /ml für doppelsträngige DNA

1 OD₂₆₀ = 40 μg /ml für einzelsträngige DNA oder RNA

5.4.4 Plasmid-DNA Aufreinigung im kleinen Maßstab zur Analyse

(Mini-Präp) (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979)

Jeweils 2ml LB-Medium mit entsprechender Antibiotika Resistenz werden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kulturen werden dann in Eppendorfgefäße überführt und sedimentiert (12000rpm, 1min.) und das Pellet in 100 μl Lösung I aufgenommen. Danach wird 200 μl Lösung II hinzugegeben und sofort gemischt. Die Proben werden dann genau 5 Minuten bei RT inkubiert, anschließend 150 μl Lösung III hinzugegeben und 5 Minuten zentrifugiert bei 13000 upm. Der Überstand wird in frische Eppendorfgefäße überführt und durch die Zugabe von 1 ml Ethanol abs. wird die Plasmid DNA gefällt. Die DNA wird durch eine 5 minütige Zentrifugation bei 13000 upm sedimentiert und das Pellet wird nach dem trocknen in 50 μl 1x TE aufgenommen. Für die anschließende Testrestriktion werden 20 μl der Plasmid-DNA Lösung eingesetzt.

5.4.7 Restriktionsendonuklease Verdau von DNA

Zu analytischen Zwecken wurden 1 µg Plasmid-DNA mit 1 U Restriktionsendonuklease in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer in 20 µl Gesamtvolumen für 1 Stunde bei der entsprechenden Temperatur, in der Regel 37 °C, verdaut. Für präparative Zwecke wurden 5-10 µg Plasmid-DNA in einem 50 µl Ansatz 2 Stunden verdaut. Die zugegebene Menge der Restriktionsendonuklease wird dem Maßstab des Verdaus angepaßt, sollte jedoch nie größer als 10 % des Gesamtvolumens sein. Somit wird sichergestellt, dass die Enzymaktivität nicht durch eine zu hohe Glycerolkonzentration gehemmt wird.

5.4.8 Agarose-Gelelektrophorese von DNA Fragmenten

Restriktionsverdaute DNA wurde in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Je nach Fragmentgröße erfolgt die Elektrophorese mit 0,8-2,0 %igen Gelen, bei einer Spannung von 15-20 V/cm in TAE-Puffer, der mit 0,01 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wird. Die Gele werden mit 0,1-3,0 µg DNA in DNA-Auftragepuffer (siehe 5.2.1) beladen. Mit Hilfe des DNA interkalierenden Ethidiumbromids kann die DNA bei einer Wellenlänge von $\lambda = 302$ nm sichtbar gemacht werden.

5.4.9 Konversion überhängender DNA-Enden

Da es in einigen Fällen nicht möglich ist, den Vektor und das DNA-Fragment (Insert) mit komplementären, überhängenden Enden zu generieren, müssen Enden ohne Überhang erzeugt werden. Dabei werden 5'-Überhänge durch eine Auffüllreaktion, 3'-Überhänge durch eine Abbaureaktion konvertiert. Hierzu wird die Plasmid-DNA nach dem Restriktionsverdau aufgereinigt und in 86 µl Wasser aufgenommen. Anschließend werden 10 µl T4-DNA-Polymerase-Puffer, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl BSA (5 mg/ml) und 2 µl T4-DNA-Polymerase (3 U/µl, New England Biolabs) zugegeben. Der Ansatz wird 30 Minuten bei 12 °C und dann für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert, aufgereinigt und anschließend zur Ligation eingesetzt.

5.4.10 Dephosphorylierung von 5'-Enden der DNA

Um eine Religation des zuvor geöffneten Vektors zu vermeiden, wird der zur Religation notwendige 5'-Phosphatrest des Vektors hydrolytisch abgespalten. Dazu wird der

Restriktionsansatz 15 Minuten vor Beendigung des Verdaus mit 0,5 µl Alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm (CIP, 10 U/µl, New England Biolabs) versetzt. Im Anschluß daran wird die Vektor DNA mit Hilfe eines Qiaquick PCR Purification Kits (Fa. Qiagen) aufgereinigt.

5.4.11 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht mit einem Skalpell aus den Agarosegelen ausgeschnitten. Zur Aufreinigung aus dem Gel wurde der Qiaquick Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen) verwendet. Falls PCR-Produkte und verdaute DNA nicht durch Gelelektrophorese von anderen DNA-Fragmenten getrennt werden mußten, wurde der PCR Purification Kit der Firma Qiagen zur Aufreinigung verwendet.

5.4.12 Ligation

In 10 µl 1xLigationspuffer (Takara) werden 20 - 50 ng Vektor-DNA mit drei Mol-Äquivalenten des zu klonierenden Fragmentes versetzt. Der Ansatz wird in Gegenwart von 1 µl T4-DNA-Ligase (2 U/µl, Takara) 2h bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

5.4.13 Polymerasekettenreaktion (PCR) (modifiziert nach Saiki *et al.*, 1985)

Die PCR Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Jeder Ansatz enthält 50 ng Plasmid-DNA, je 50 pmol eines 5'- und eines 3'-Oligodesoxynukleotides (Primer), 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 5 µl (10x) PCR-Puffer und 1 U Taq-Polymerase. Alle PCR Experimente laufen nach folgendem Programm ab, wobei die Annealing Temperatur von der Art der verwendeten Primer abhängt und die Elongationszeit von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes (1 Minute pro 1 kb).

Vordenaturierung	2 min.	95°C
Denaturierung	15 Sekunden	95 °C
Primer-Anlagerung	30 Sekunden	52-66 °C (je nach Primer)
Taq-Polymerase Reaktion	60 Sekunden	72 °C

Nach dem letzten Zyklus wird der Reaktionsansatz für 5 Minuten bei 72 °C inkubiert. Je 5-15 µl eines Ansatzes werden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

5.4.14 Real-Time PCR

Für die Real Time PCR wurden „Assays on Demand“ von Applied Biosystems verwendet (siehe Anhang), die möglichst über Exon/Intron Grenzen verliefen. Normiert wurden die Genexpressionen auf die Menge an Gapdh oder auf die Menge an Succinat-Dehydrogenase.

5.4.15 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Die für die Hybridisierungstechniken verwendeten radioaktiv markierten Sonden werden unter Verwendung des Megaprime Labeling Kits (Fa. Amersham) hergestellt. Den Angaben des Herstellers entsprechend werden 50 ng des zu markierenden DNA Fragmentes, 50 μ Ci α - 32 P-dCTP und 5 U Klenow-Fragment eingesetzt, und der Ansatz 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nicht eingebaute freie Nukleotide werden unter Verwendung des Nucleotide Removal-Kits der Fa. Qiagen nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Vor Einsatz der radioaktiv markierten Sonden werden diese für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert.

5.4.16 Transfer von DNA (Southern Blot)

Die DNA-Fragmente werden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Gel 20 Minuten in 0,25 M HCl depuriniert und danach in 0,4 M NaOH neutralisiert (20 Minuten). Zum Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Blotting-Nylon Membran, Fluka) wird die Methode des Schwerkraft-Alkali-Transfers verwendet. Dazu wird auf einen ca. 10 cm hohen Stapel Papier 5 Lagen trockenes Whatman Papier 3M gelegt und zwei Lagen in 0,4M NaOH angefeuchtetes Whatman Papier 3M. Dann folgt die angefeuchtete Nylonmembran, das Gel und zwei angefeuchtete Whatman Papiere. Zum Schluß wird eine Brücke aus Whatman Papieren über den Blot gelegt, die rechts und links vom Blot in Behälter ragen, die mit 0,4M NaOH gefüllt sind. Der Transfer der DNA läuft über Nacht. Die Nylonmembran wird anschließend mit 1x SSC abgespült und die DNA wird durch UV-Vernetzung in einem Stratalinker (Fa. Stratagene) bei 120 mJ kovalent an die Membran gebunden.

5.4.17 Hybridisierung von DNA auf Nylonmembranen

Für die Hybridisierung der DNA wird die Nylonmembran zuerst in einer Prä-Hybridisierungslösung 2h bei 65°C Inkubiert. Danach wird die Membran über Nacht bei

65°C in Hybridisierungspuffer mit der zuvor bei 95°C denaturierten DNA Sonde hybridisiert. Anschließend wird die Membran mehrfach mit 2X SSC/0,5% SDS gewaschen. Die Auswertung erfolgt autoradiographisch.

Prähybridisierungslösung:	4 ml 20X SSC
	4 ml 10% SDS
	0,2 g Magermilchpulver
	3 ml Heringssperma DNA (10mg/ml)
	ad 40 ml

Hybridisierungslösung:	4 ml 20X SSC
	4 ml 10% SDS
	0,2 g Magermilchpulver
	3 ml Heringssperma DNA (10mg/ml)
	ad 40 ml

5.4.18 Isolierung von RNA

Das Arbeiten mit RNA erfordert besondere Vorsichtsmaßnahmen zum Schutz vor RNase-Kontaminationen. Deshalb werden ausschließlich bei 180 °C hitzesterilisierte Geräte verwendet. Lösungen werden mit Wasser angesetzt, welches zuvor mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt worden ist (0,1 % DEPC, mehrere Stunden bei RT gerührt, autoklaviert). Die Gesamt-RNA wird mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen, oder durch die Verwendung des chaotropen Salzes Guanidiniumisothiocyanat in Kombination mit Phenol (PeqGold der Fa. PeqLab) nach Angaben des Herstellers isoliert. Zur Qualitätskontrolle wird 1µg der RNA im Agarosegel aufgetrennt. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgt photometrisch. Die RNA wird bei -80°C gelagert.

5.4.19 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription werden 4 µg DNase verdaute Gesamt-RNA eingesetzt. Die Erstrangsynthese erfolgt nach den Angaben des Herstellers der verwendeten Superscript II TM Reversen Transkriptase der Fa. Invitrogen.

5.5 Protein-Techniken

5.5.1 Herstellung von Gesamtzellproteinextrakten

Zur Isolierung von gesamtzellulären Proteinen werden Zellen einer konfluent bewachsenen Gewebekulturschale oder Suspensionszellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die adhärent wachsenden Zellen werden anschließend mit Hilfe eines Gummischabers in 1 ml PBS von der Schale abgelöst. Die Zellen werden dann abzentrifugiert (Minifuge, 2 Minuten, 2000 Upm, 4 °C) und in 100 µl WCE-Puffer (inkl. Proteaseinhibitoren (siehe 5.2.1), frisch zugeben) aufgenommen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorffzentrifuge, 10 Minuten, 14000 Upm, 4 °C). Die im Überstand enthaltenen Proteine werden nach einer Konzentrationsbestimmung nach Bradford, 1976 in Aliquots bei -80 °C gelagert.

5.5.2 Auftrennung von Proteinen (SDS-Page) (Laemmli, 1970)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen werden diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Zunächst wird das Trenngel gegossen und mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wird der Isopropanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt.

Die Proteinproben werden vor der Elektrophorese mit einem Volumen 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgt bei 20-80 mA für 2-3 Stunden in 1x SDS-Laufpuffer.

Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
	0,4%	SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
	0,4%	SDS
10x SDS-Laufpuffer	0,25 M	Tris-Base
	1,9 M	Glyzin
	1%	SDS

Rotiphorese® Gel 30 (Roth)	30%	Acrylamid
	0,8%	Bisacrylamid

Tabelle 1: Zusammensetzung der denaturierenden Proteingele

	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12,5 %	15 %	4 %
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	–
Sammelgelpuffer	–	–	–	1,25 ml
H ₂ O	4,09 ml	3,25 ml	2,42 ml	3,03 ml
Rotiphorese® Gel 30	3,33 ml	4,17 ml	5,00 ml	0,67 ml
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	25 µl

5.5.3 Protein-Transfer (Semi-dry Western-Blot) (modifiziert nach Khyse-Anderson, 1984)

Für die Immobilisierung von Proteinen auf einer Membran wurde das sogenannte „semi-dry“ Verfahren in einer Transfer-Apparatur (Fa. Biorad) angewandt. Dazu wird auf der Anodenplatte ein Blot in nachstehender Reihenfolge aufgebaut: 3 Whatman 3MM-Papiere mit Transferpuffer angefeuchtet, eine Nitrozellulosemembran (Fa. Schleicher & Schuell) ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtet, das Proteingel und abschließend 3 Whatman 3MM-Papiere mit Transferpuffer angefeuchtet. Der Transfer findet für 1 Stunden bei 1,5 mA/cm² Membran statt. Danach wird die Membran zur Kontrolle eines homogenen Transfers mit 0,2 % (w/v) Ponceau-S in 3 % (w/v) Trichloressigsäure gefärbt und mit PBS wieder entfärbt.

Transferpuffer	5,28 g Tris-Base
	2,93 g Glycin
	3,75 ml 10% SDS
	200 ml Methanol
	ad 1000 ml

5.5.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Vor Zugabe des primären Antikörpers wird zur Absättigung freier unspezifischer Bindungsstellen die Membran zunächst für 30 Minuten in PBS/ 0,1 % Tween20 / 5 % Magermilchpulver geschwenkt. Hiernach wird der Erst-Antikörper in entsprechender Verdünnung in derselben Lösung zugegeben und für 2 Stunden unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS/0,1 % Tween20 wird die Membran für 1 Stunde bei RT mit einem Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Der Blot wird nach wiederholtem Waschen mit PBS/0,1 % Tween20 in ein luminiszierenden Lösung der Fa. Amersham (ECL) gelegt und anschließend autoradiographisch ausgewertet.

5.6 Zellkultur-Techniken

5.6.1 Medien/Lösungen und mitogene Substanzen

anti-CD3ε	1 mg/ml (Klon 2C11; Fa. Pharmingen)
anti-CD28	1 mg/ml (Klon 37.51; Fa. Pharmingen)
anti-CD95	1mg/ml (Klon jo-2; Fa. Pharmingen)
2-Mercaptoethanol	10 mM (Fa. Invitrogen)
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium mit 4,5 % (w/v) Glucose; pH 7,0 (Fa. Invitrogen)
FBS	Fötales Rinderserum (Fa. Invitrogen)
Gentamicin	10 mg/ml H ₂ O (Fa. Invitrogen)
Interleukin-2 (recombinant)	1 µg/µl in Wasser (Fa. tebu-bio)
L-Glutamin	200 mM L-Glutamin in PBS (Fa. Invitrogen)
Mitomycin C	1 mg/ml PBS (Fa. Sigma)
Na-Pyruvat	100 mM (Fa. Invitrogen)
nicht-essentielle Aminosäuren	100x in PBS (Fa. Invitrogen)
Penicillin/Streptomycin	10.000 U Penicillin/10.000 U Streptomycin (Fa. Invitrogen)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium; pH 7,0 (Fa. Invitrogen)
Trypsin/EDTA	1x Trypsin/EDTA (Fa. ICN)

ESGRO-Lif	10^7 Units/ml
G418	100 mg/ml in PBS (Fa. Invitrogen)
Ganciclovir (Cymeven)	400 mM in PBS (Fa. Syntex, Roche)

5.6.2 ES-Zellkultur

Zur Herstellung heterozygoter Evi5^{+/-} ES-Zellen wurde die ES-Zelllinie R1 verwendet. Die Kultivierung erfolgte in Cytoperm Brutschränken (Fa. Heraeus) bei 6,5 % CO₂-Gehalt und 95 % relativer Luftfeuchte. ES-Zellen wurden stets auf MEF-Zellen in Anwesenheit von 500 U/ml LIF (Leukemia Inhibitory Factor) kultiviert. Zur Vorbereitung der Zellen für die Blastozysten-Injektion oder Elektroporation wurden die ES-Zellen von den MEFs getrennt. Dazu wurden sie für ca. 40 Minuten auf MEF-freie Kulturschalen inkubiert und anschließend der Überstand mit den ES-Zellen abgenommen.

ES-Zellmedium	80 %	DMEM
	20 %	FBS
	0,1 mM	nicht-essentielle Aminosäuren
	1 mM	Na-Pyruvat
	2 mM	L-Glutamin
	10^{-6} M	2-Mercaptoethanol
	1.000 U	Penicillin/Streptomycin
	500 U	LIF

5.6.3 Transfektion und Selektion von ES-Zellen

Die Transfektion der ES-Zellen erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurden 5×10^7 R1 ES-Zellen in 750 µl PBS aufgenommen und 30 µg linearisierte Vektor-DNA in 50 µl PBS hinzugegeben. Die Elektroporation erfolgte durch einen Stromstoß von 800 V und 3 µF mittels Gene Pulser II der Fa. Biorad. Anschließend wurden die Zellen, nach einer zwanzigminütigen Inkubation bei 4° C, mit 9,5 ml ES-Zellmedium verdünnt und jeweils 1 ml auf eine 90 mm Platte in 10 ml ES-Zellmedium (Fa. Nunc), auf Neomycin-resistente MEF-Zellen ausgesät. 24 Stunden nach der Elektroporation wurde das Medium gegen Selektionsmedium mit 175 µg/ml G418 und 2 µM Ganciclovir ausgetauscht. Nach ca. 7-9 Tagen Selektion mit täglichem Mediumwechsel, konnten einzelne Klone mit Hilfe eines

Mikroskops isoliert und in 96er Lochplatten transferiert werden. Nach Dichtwachsen der 96er Lochplatten wurden die Zellen auf eine mit MEF-Zellen bedeckte 48er und eine gelatinisierte 24er Lochplatte aufgeteilt. Die 48er Lochplatte wurde nach zwei weiteren Tagen Kultur und Zugabe von 200 µl Einfriermedium pro Vertiefung bei -80 °C eingefroren. Die 24er Lochplatte diente zur DNA-Extraktion und deren Analyse durch das Southern Blot Verfahren. Nach Identifizierung von Klonen mit entsprechender homologer Rekombination, wurden diese aus der 48er Lochplatte aufgetaut und expandiert.

5.6.4 Herstellung embryonaler Mausfibroblasten (MEFs)

Trächtige Neo-resistente C57Bl/6 Mäuse wurden am Tag 13-14 *post coitum* getötet und die Embryonen isoliert. Nach Entfernung des Kopfes und aller inneren Organe wurde der Torso mechanisch zerkleinert. Das Gewebe wurde einmal mit PBS gewaschen und für 2 x 15 Minuten in Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Die jeweiligen Überstände wurden abgenommen und ein gleicher Teil Medium hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro 145 mm Zellkulturschale (Fa. Nunc) ausgesät. Konfluent gewachsene Kulturen wurden im Verhältnis 1:5 aufgeteilt. Vor Einsatz der MEF-Zellen für die ES-Kultur wurden diese für 3 Stunden mit Mitomycin C (0,01 mg/ml) behandelt, trypsinisiert und auf entsprechende 90 mm Kulturschalen bzw. 96er und 48er Lochplatten ausplattiert.

5.6.5 Passagieren von Zellen

Zellen, die Gewebekulturschalen konfluent bewachsen, müssen auf neue Kulturschalen verteilt werden. Die Ablösung der Zellen erfolgt nach einmaligem Waschen mit PBS durch Inkubation in 0,5 % Trypsin/0,2 % EDTA. Der Prozeß wird durch Zugabe des fünffachen Volumens Zellkulturmedium (DMEM+10 % FBS) gestoppt und die Zellen auf neue Schalen ausgesät.

5.6.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die langfristige Lagerung von Zelllinien werden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000 Upm pelletiert und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird in Einfrier Röhrchen (Fa. Nunc) transferiert und bei -80 °C eingefroren. Nach 24 Stunden werden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen der

Zellen erfolgt möglichst schnell in einem 37 °C-warmen Wasserbad. Anschließend werden die Zellen in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und entsprechendes Medium zugefügt.

Einfriermedium	10%	DMSO
	90%	FBS

5.6.7 Isolation von T-Zellen aus Organen

Bei den Versuchen mit primären T-Zellen war es notwendig, zunächst die Zellen in Suspension zu bringen. Dazu werden Thymus und Milz zwischen zwei geschliffenen Objektträgern in kaltem PBS/1 % FBS zerrieben. Die Zellen werden gewaschen und zur Abtrennung von Gewebereste über mit Baumwolle gestopfte Pasteurpipetten filtriert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1000 Upm werden die Zellen in MTC Medium (siehe 5.6.10) aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte stets mit dem Zellzählgerät CASY-1 (Fa. Schärfe).

5.6.8 Erythrocytenlyse

Vor der weiteren Aufreinigung von Lymphocyten, besonders aus der Milz, ist es notwendig die Erythrocyten zu lysieren. Dazu werden abzentrifugierte Zellen aus einer Milz in 1 ml 1x Ammoniumchlorid-Lysispuffer (Fa. Pharmingen) aufgenommen und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend werden 10 ml vollständiges MTC Medium hinzugegeben, um die Lysereaktion zu stoppen. Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen zur weiteren Verwendung in Medium oder PBS/1% FBS aufgenommen.

5.6.9 Aufreinigung von Zellen durch MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)

Die magnetische Sortierung von Zellen ermöglicht die quantitative Ausbeute hochreiner Zellpopulationen aus verschiedenen Geweben (hier: Milz). Die Zellen werden dabei entweder negativ sortiert, d. h. alle nicht gewünschten Zellen werden aus dem Zellgemisch depletiert, oder die gewünschten Zellen werden positiv, direkt aus dem Zellgemisch sortiert. Im ersten Fall werden alle unerwünschten Zelltypen mit einem Biotin Antikörpergemisch markiert und in der negativen, ungefärbten Elutionsfraktion befindet sich der gewünschte Zelltyp. Im zweiten Fall werden die gewünschten Zellen mit einem bestimmten biotinylierten, oder auch

direkt an magnetische Beads gekoppelten Antikörper inkubiert und anschließend enthält die positive, gefärbte Elutionsfraktion die gewünschten Zellen. Die an Microbeads gebundenen Zellen können in einem magnetischen Feld über eine Säule des autoMACS-Geräts getrennt werden. Für die T-Zellisolation wurde ausschließlich das Pan T-Zellisolutions Kit der Fa. Miltenyi Biotec verwendet, wobei die T-Zellen unter Depletion sortiert werden, um eine eventuelle Vorstimulation durch T-Zell spezifische Antikörper zu vermeiden. Die methodischen Einzelheiten der Aufreinigung sind aus den Angaben des Herstellers ersichtlich (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Die Qualität der Aufreinigung wurde stets mittels Durchflusszytometrie überprüft und lag durchschnittlich bei 90 % bis 98 %.

5.6.10 Kultivierung von murinen Lymphocyten

Die Kultivierung primärer Lymphozytenkulturen erfolgte in Cytoperm Brutschränken bei 37 °C, 5% CO₂ in MTC-Medium. Alle Stimulationsexperimente wurden mit einer Zelldichte von 1-2x10⁶ Zellen/ml in MTC Medium auf 48er Lochplatten durchgeführt.

MTC-Medium	85%	RPMI 1640
	15%	FBS
	0,1 mM	nicht-essentielle Aminosäuren
	1 mM	Na-Pyruvat
	2 mM	L-Glutamin
	10 ⁻⁶ M	2-Mercaptoethanol
	1000 U	Penicillin/Streptomycin
	100 µg/ml	Gentamicin

5.7 Durchflusszytometrie (FACS, Fluoreszenz Activated Cell Sorting)

5.7.1 Darstellung von Oberflächenmarkern

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) können Zellpopulationen aufgrund ihrer Morphologie, der Expression fluoreszierender Moleküle wie dem GFP-Protein, und durch Darstellung von Oberflächenmolekülen über Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Antikörper

analysiert und sortiert werden. Für die Analyse von Oberflächenproteinen auf Leukocyten werden Einzelzellsuspensionen, wie unter 5.6.7 beschrieben, hergestellt. 1×10^6 Zellen werden in 100 μ l PBS/2 % FBS aufgenommen und in 5 ml Polystyren Rundbodenröhrchen überführt. Um unspezifische Bindungen der Oberflächen Antikörper an Fc Fragmente von Oberflächen Immunglobulinen zu vermeiden, werden die Zellen mit 1 μ l α Fc γ III/II Rezeptor Antikörper versetzt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Dann werden die entsprechenden Mengen an Fluorochrom- oder Biotin-gekoppelter Antikörper (je nach Hersteller 1-5 μ l Antikörperlösung) hinzugegeben und die Ansätze für 15 Minuten unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Die Proben werden nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS in 1 ml PBS resuspendiert. Die Analyse der Zellen erfolgte unter Verwendung eines FACScalibur (Fa. Becton Dickinson) und mittels der Computerprogramme CellQuest (Fa. Becton Dickinson) und FlowJO (Tree Star). Dabei wurden zunächst über die Parameter Vor- und Seitwärtsstreulicht die lebenden Zellen elektronisch ausgewählt und mindestens 10.000 Zellen aufgenommen.

5.7.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Jeweils 1×10^6 T-Zellen werden für zwei Tage mit α CD3+ α CD28 Antikörpern in 1 ml MTC Medium pro 48 Well kultiviert. Für die Stimulation wurden die Antikörper vor der Zugabe der Zellen immobilisiert. Dazu werden in 100 μ l PBS pro Well, 2 μ g α CD3 + 2 μ g α CD28 Antikörper hinzugegeben und über Nacht bei 4°C oder 1h bei 37°C inkubiert. Wurden T-Zellen von Virus infizierten Mäusen verwendet, so war die Vorstimulation von zwei Tagen mit α CD3+ α CD28 Antikörpern nicht nötig. Für die Zytokinproduktion erfolgt eine Zweitstimulation mit α CD3+ α CD28 Antikörpern (jeweils 2 μ g pro Well) für 5h bei 37°C mit 2 μ g Brefeldin A pro Well, im Fall der Virus infizierten Zellen. Bei nicht infizierten Zellen erfolgte die Zweitstimulation mit PMA (1:100 000; Stock 400 μ M) + Ionomycin (1:1000; Stock 1 mg/ml) ebenfalls für 5h bei 37°C mit 2 μ g Brefeldin A pro Well. Anschließend werden die gewünschten Oberflächenmoleküle gefärbt wie unter 5.7.1 beschrieben. Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurde zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen das CytoFix/CytoPerm-Kit (Becton Dickinson) nach Angaben des Herstellers benutzt. Vor der Färbung der Zellen werden diese mit 1 μ l α Fc γ III/II Rezeptor Antikörper in 100 μ l CytoPerm Waschpuffer 10 Minuten inkubiert und anschließend mit den spezifischen Antikörpern in derselben Lösung gefärbt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis im Dunkeln werden die

Zellen mit CytoFix/CytoPerm Lösung gewaschen und in PBS für die FACS-Analyse aufgenommen.

5.7.3 Detektion apoptotischer Zellen über AnnexinV Färbung

Jeweils 1×10^6 T-Zellen werden für 24h mit 2 μg zuvor immobilisierten αCD3 Antikörper + IL-2 (20 ng/ml) in 1 ml MTC Medium pro Well kultiviert. Nach den 24h Vorinkubation werden die Zellen auf frische 48er Lochplatten überführt, auf die entweder zuvor 2 μg αCD3 Antikörper, oder 10 μg αCD95 Antikörper pro Well zur Immobilisation gegeben worden ist. Die Zellen werden unter IL-2 Zugabe (10 ng/ml) 12h bei 37°C inkubiert. Die Analyse apoptotischer Zellen erfolgte unter Verwendung des „Apoptosis Detection Kit“ der Fa. Pharmingen nach Protokoll des Herstellers.

5.7.4 Untersuchung des Zellzyklus durch Propidium Iodid Färbung

Die Zellvermehrung ist mit der Replikation genomischer DNA verbunden, so dass die DNA Neusynthese als Maß für die Zellproliferation verwendet werden kann. Propidium Iodid (PI) ist ein DNA interkalierender Farbstoff, wodurch anhand der PI Menge Rückschlüsse auf die DNA Menge innerhalb der Zellen geschlossen werden kann. Zur Untersuchung des Zellzyklus der peripheren T-Zellen werden die Zellen 24h, 48h und 72h mit $\alpha\text{CD3}+\alpha\text{CD28}$ Antikörpern wie unter 5.7.2 beschrieben stimuliert. Der DNA Gehalt der Zellen wird dann vor der Stimulation und zu den verschiedenen Zeitpunkten anhand der PI Menge bestimmt. Dazu wurden die Zellen geerntet und als erstes alle Oberflächenmarkierungen wie unter 5.7.1 beschrieben durchgeführt. Nach dem Waschen mit PBS werden die Zellen in 100 μl CytoPerm/CytoFix Waschlösung aufgenommen und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wird 1 ml einer 1:50 verdünnten PI Lösung (Stock: 10mg/ml) hinzugegeben, die RnaseA (1:40; Stock 10 mg/ml) enthält. Die Zellen werden weitere 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend direkt in dieser Lösung nach vorheriger Filtration, im Durchflusszytometer analysiert.

5.7.5 Untersuchung der T-Zellproliferation durch CFSE Färbung

5.7.5.1 *In vitro* Proliferation von T-Zellen

CFSE (Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidyl-ester) reagiert spontan und irreversibel mit Lysinresten oder anderen Aminen innerhalb der Zelle. Nach 24h ist die Fluoreszenz innerhalb der ruhenden Zellen über Monate stabil. Teilen sich die Zellen, so verringert sich auch die CFSE Fluoreszenz und wird zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen übertragen. Auf diese Weise können bis zu acht Zellteilungen proliferierender Zellen aufgenommen werden. Zur Untersuchung der Zellproliferation der peripheren T-Zellen *in vitro* wurden die T-Zellen mit Hilfe des autoMACs (5.6.9) sortiert und anschließend mit CFSE gefärbt. Dazu wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und mit 1 ml CFSE Lösung (1:1000 in PBS, Stock 10 mM in DMSO) versetzt und genau 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch die Zugabe des 10 x Volumens PBS/10% FBS gestoppt und die Zellen im Anschluß daran zweimal gewaschen. $1-2 \times 10^6$ T-Zellen werden dann auf 48er Lochplatten wie unter 5.7.2 beschrieben stimuliert. Die Analyse der Zellen erfolgt nach 72h Stimulation.

5.7.5.2 *In vivo* Proliferation von T-Zellen

Für die Untersuchung der *in vivo* Proliferation der T-Zellen, wurden entweder CD8 restringierte OT-I T-Zellen, oder CD4 restringierte OT-II T-Zellen aus den entsprechenden transgenen Mäusen isoliert, sortiert und mit CFSE, wie oben beschrieben gefärbt. 4-5 Millionen TCR transgene T-Zellen in 200 μ l PBS werden über die Schwanzvene in Empfänger Mäuse transplantiert, die 24h zuvor mit PBS oder mit 50 μ g des entsprechenden Peptides in 200 μ l PBS injiziert worden sind. Für die Stimulation der OT-I T-Zellen wird das Ova₂₅₇₋₂₆₄ Peptid SIINFEKL verwendet und für die Stimulation der OT-II T-Zellen das Ova₃₂₆₋₃₃₉ Peptid ISQAVHAAHAEINEAGR. Die Analyse der T-Zellen erfolgt nach drei Tagen. Dazu werden die Milzen der Mäuse entfernt, eine Einzelsuspension hergestellt und die Zellen entweder mit α CD8 oder mit α CD4 und zusätzlich mit V α 2 Antikörper gefärbt. Mindestens 1000 CD3⁺/CD4⁺/8⁺/V α 2⁺ Zellen wurden im Durchflusszytometer aufgenommen.

6 Literaturverzeichnis

- Adler, S. H., *et al.* (2003); "Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression." *J Immunol* 171(6): 2896-903.
- Alnemri, E. S., *et al.* (1996); "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." *Cell* 87(2): 171.
- Anderson, S. J. und R. M. Perlmutter (1995); "A signaling pathway governing early thymocyte maturation." *Immunol Today* 16(2): 99-105.
- Asarnow, D. M., *et al.* (1988); "Limited diversity of gamma delta antigen receptor genes of Thy-1+ dendritic epidermal cells." *Cell* 55(5): 837-47.
- August, A., *et al.* (1994); "CD28 is associated with and induces the immediate tyrosine phosphorylation and activation of the Tec family kinase ITK/EMT in the human Jurkat leukemic T-cell line." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(20): 9347-51.
- Bachmann, M. F., *et al.* (1999); "Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection." *Eur J Immunol* 29(1): 291-9.
- Banchereau, J., *et al.* (2000); "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.
- Baron, J. L., *et al.* (1993); "Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma." *J Exp Med* 177(1): 57-68.
- Ben-David, Y. und A. Bernstein (1991); "Friend virus-induced erythroleukemia and the multistage nature of cancer." *Cell* 66(5): 831-4.
- Ben-David, Y., *et al.* (1991); "A mammalian protein kinase with potential for serine/threonine and tyrosine phosphorylation is related to cell cycle regulators." *Embo J* 10(2): 317-25.
- Ben David, Y., *et al.* (1988); "Inactivation of the p53 oncogene by internal deletion or retroviral integration in erythroleukemic cell lines induced by Friend leukemia virus." *Oncogene* 3(2): 179-85.
- Bendelac, A. (1995); "Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes." *J Exp Med* 182(6): 2091-6.
- Bensussan, A., *et al.* (1990); "Selective induction of autocytotoxic activity through the CD3 molecule." *Eur J Immunol* 20(12): 2615-9.
- Berke, G. (1995); "The CTL's kiss of death." *Cell* 81(1): 9-12.
- Boise, L. H., *et al.* (1995); "CD28 and apoptosis." *Curr Opin Immunol* 7(5): 620-5.
- Boismenu, R. und W. L. Havran (1997); "An innate view of gamma delta T cells." *Curr Opin Immunol* 9(1): 57-63.
- Boldin, M. P., *et al.* (1995); "A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain." *J Biol Chem* 270(14): 7795-8.
- Bommireddy, R., *et al.* (2003); "TGF-beta 1 regulates lymphocyte homeostasis by preventing activation and subsequent apoptosis of peripheral lymphocytes." *J Immunol* 170(9): 4612-22.
- Bonecchi, R., *et al.* (1998); "Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s." *J Exp Med* 187(1): 129-34.
- Born, W., *et al.* (1999); "Immunoregulatory functions of gamma delta T cells." *Adv Immunol* 71: 77-144.
- Bosselut, R., *et al.* (2001); "Strength of signaling by CD4 and CD8 coreceptor tails determines the number but not the lineage direction of positively selected thymocytes." *Immunity* 14(4): 483-94.
- Bouillet, P., *et al.* (1999); "Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity." *Science* 286(5445): 1735-8.
- Bratton, D. L., *et al.* (1997); "Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase." *J Biol Chem* 272(42): 26159-65.
- Britt, W. J. und B. Chesebro (1983); "H-2D control of recovery from Friend virus leukemia: H-2D region influences the kinetics of the T lymphocyte response to Friend virus." *J Exp Med* 157(6): 1736-45.
- Bruno, L., *et al.* (1995); "On the cellular basis of immunological T cell memory." *Immunity* 2(1): 37-43.
- Campbell, D. J., *et al.* (2001); "Separable effector T cell populations specialized for B cell help or tissue inflammation." *Nat Immunol* 2(9): 876-81.
- Carpenter, P. A., *et al.* (2000); "Non-Fc receptor-binding humanized anti-CD3 antibodies induce apoptosis of activated human T cells." *J Immunol* 165(11): 6205-13.
- Castedo, M., *et al.* (1996); "Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis." *J Immunol* 157(2): 512-21.
- Ceredig, R. und T. Rolink (2002); "A positive look at double-negative thymocytes." *Nat Rev Immunol* 2(11): 888-97.
- Champagne, P., *et al.* (2001); "Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes." *Nature* 410(6824): 106-11.
- Chan, A. C., *et al.* (1995); "Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function." *Embo J* 14(11): 2499-508.

- Chen, W., et al.** (1996); "Identification of a gag-encoded cytotoxic T-lymphocyte epitope from FBL-3 leukemia shared by Friend, Moloney, and Rauscher murine leukemia virus-induced tumors." J Virol 70(11): 7773-82.
- Cheng, A. M. und A. C. Chan** (1997); "Protein tyrosine kinases in thymocyte development." Curr Opin Immunol 9(4): 528-33.
- Cheng, T., et al.** (2000); "Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1." Science 287(5459): 1804-8.
- Chesebro, B., et al.** (1990); "Host genetic control of spontaneous and induced immunity to Friend murine retrovirus infection." Annu Rev Immunol 8: 477-99.
- Chesebro, B. und K. Wehrly** (1978); "Rfv-1 and Rfv-2, two H-2-associated genes that influence recovery from Friend leukemia virus-induced splenomegaly." J Immunol 120(4): 1081-5.
- Chesebro, B. und K. Wehrly** (1979); "Identification of a non-H-2 gene (Rfv-3) influencing recovery from viremia and leukemia induced by Friend virus complex." Proc Natl Acad Sci U S A 76(1): 425-9.
- Chien, Y. H., et al.** (1996); "Recognition by gamma/delta T cells." Annu Rev Immunol 14: 511-32.
- Chinnaiyan, A. M., et al.** (1995); "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." Cell 81(4): 505-12.
- Cho, B. K., et al.** (1999); "Functional differences between memory and naive CD8 T cells." Proc Natl Acad Sci U S A 96(6): 2976-81.
- Chuang, E., et al.** (1999); "Regulation of cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 by Src kinases." J Immunol 162(3): 1270-7.
- Chung, C. D., et al.** (1997); "Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3." Science 278(5344): 1803-5.
- Cilio, C. M., et al.** (1998); "Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 is induced in the thymus upon in vivo activation and its blockade prevents anti-CD3-mediated depletion of thymocytes." J Exp Med 188(7): 1239-46.
- Constant, S. L. und K. Bottomly** (1997); "Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches." Annu Rev Immunol 15: 297-322.
- Crespo, P., et al.** (1996); "Rac-1 dependent stimulation of the JNK/SAPK signaling pathway by Vav." Oncogene 13(3): 455-60.
- Crespo, P., et al.** (1997); "Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product." Nature 385(6612): 169-72.
- Croft, M., et al.** (1994); "Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells." J Immunol 152(6): 2675-85.
- Crowley, M. P., et al.** (2000); "A population of murine gammadelta T cells that recognize an inducible MHC class Ib molecule." Science 287(5451): 314-6.
- Curtsinger, J. M., et al.** (1998); "CD8+ memory T cells (CD44^{high}, Ly-6C⁺) are more sensitive than naive cells to (CD44^{low}, Ly-6C⁻) to TCR/CD8 signaling in response to antigen." J Immunol 160(7): 3236-43.
- D'Ambrosio, D., et al.** (1998); "Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells." J Immunol 161(10): 5111-5.
- D'Andrea, A. D.** (1992); "The interaction of the erythropoietin receptor and gp55." Cancer Surv 15: 19-36.
- Dai, Z., et al.** (2000); "The dual role of IL-2 in the generation and maintenance of CD8+ memory T cells." J Immunol 165(6): 3031-6.
- Dale, D. C., et al.** (2000); "Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia." Blood 96(7): 2317-22.
- Dean, M., et al.** (1986); "Regulation of c-myc transcription and mRNA abundance by serum growth factors and cell contact." J Biol Chem 261(20): 9161-6.
- Derijard, B., et al.** (1994); "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." Cell 76(6): 1025-37.
- Dietz, M. und M. Rick** (1972); "Effect of host strain and H-2 type on spontaneous regression of murine leukemia virus." Int. J. Cancer 10: 99-104.
- Dong, Z., et al.** (1997); "Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases." Am J Pathol 151(5): 1205-13.
- Duan, Z. und M. Horwitz** (2003); "Targets of the transcriptional repressor oncoprotein Gfi-1." Proc Natl Acad Sci U S A 100(10): 5932-7.
- Duke, R. C. und J. J. Cohen** (1986); "IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells." Lymphokine Res 5(4): 289-99.
- Eberl, G., et al.** (2000); "Selective bystander proliferation of memory CD4+ and CD8+ T cells upon NK T or T cell activation." J Immunol 165(8): 4305-11.
- Ebnet, K., et al.** (1995); "Granzyme A-deficient mice retain potent cell-mediated cytotoxicity." Embo J 14(17): 4230-9.
- Edelmann, K. H. und C. B. Wilson** (2001); "Role of CD28/CD80-86 and CD40/CD154 costimulatory interactions in host defense to primary herpes simplex virus infection." J Virol 75(2): 612-21.

- Erickson, P. F., et al.** (1994); "The ETO portion of acute myeloid leukemia t(8;21) fusion transcript encodes a highly evolutionarily conserved, putative transcription factor." *Cancer Res* 54(7): 1782-6.
- Fehling, H. J., et al.** (1995); "Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells." *Nature* 375(6534): 795-8.
- Fischer, K. D., et al.** (1995); "Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4+ CD8+ thymocytes." *Nature* 374(6521): 474-7.
- Frank, R., et al.** (1995); "The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B." *Oncogene* 11(12): 2667-74.
- Friend, C.** (1957); "Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia." *J Exp Med* 105(4): 307-18.
- Garcia, S., et al.** (1999); "Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation." *Immunity* 11(2): 163-71.
- Germain, R. N.** (1994); "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation." *Cell* 76(2): 287-99.
- Gessner, A. and M. Rollinghoff** (2000); "Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes." *Immunobiology* 201(3-4): 285-307.
- Gilks, C. B., et al.** (1993); "Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein." *Mol Cell Biol* 13(3): 1759-68.
- Gilmore, T. D., et al.** (1996); "Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer." *Oncogene* 13(7): 1367-78.
- Godfrey, D. I., et al.** (1994); "Onset of TCR-beta gene rearrangement and role of TCR-beta expression during CD3-CD4-CD8- thymocyte differentiation." *J Immunol* 152(10): 4783-92.
- Godfrey, D. I., et al.** (1993); "A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression." *J Immunol* 150(10): 4244-52.
- Godfrey, D. I. und A. Zlotnik** (1993); "Control points in early T-cell development." *Immunol Today* 14(11): 547-53.
- Goodman, T. und L. Lefrancois** (1988); "Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes." *Nature* 333(6176): 855-8.
- Greenberg, P. D. und M. A. Cheever** (1985); "Treatment of established tumor by adoptive immunotherapy with specifically immune T cells." *Surv Immunol Res* 4(4): 283-96.
- Grimes, H. L., et al.** (1996); "The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal." *Mol Cell Biol* 16(11): 6263-72.
- Gross, A., et al.** (1999); "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* 13(15): 1899-911.
- Gross, A., et al.** (1999); "Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death." *J Biol Chem* 274(2): 1156-63.
- Habets, G. G., et al.** (1994); "Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins." *Cell* 77(4): 537-49.
- Hamilton, S. E., et al.** (2001); "Listeria monocytogenes infection overcomes the requirement for CD40 ligand in exogenous antigen presentation to CD8(+) T cells." *J Immunol* 167(10): 5603-9.
- Han, J., et al.** (1997); "Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases." *Mol Cell Biol* 17(3): 1346-53.
- Harty, J. T. und M. J. Bevan** (1999); "Responses of CD8(+) T cells to intracellular bacteria." *Curr Opin Immunol* 11(1): 89-93.
- Hasenkrug, K. J., et al.** (1995); "Passive immunotherapy for retroviral disease: influence of major histocompatibility complex type and T-cell responsiveness." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(23): 10492-5.
- Hasenkrug, K. J., et al.** (1996); "Differing T-cell requirements for recombinant retrovirus vaccines." *J Virol* 70(1): 368-72.
- Hatada, M. H., et al.** (1995); "Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor." *Nature* 377(6544): 32-8.
- Hayday, A. und D. Gibbons** (2001); "Regulated T-cell development: a victim of multiple conspiracies." *Immunology* 104(1): 8-10.
- Hayday, A. C.** (2000); "[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection." *Annu Rev Immunol* 18: 975-1026.
- Hendriks, J., et al.** (2000); "CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity." *Nat Immunol* 1(5): 433-40.
- Hengartner, M. O.** (2001); "Apoptosis: corralling the corpses." *Cell* 104(3): 325-8.
- Herley MT, D. A. A., Ney PA** (1999); "Physical and functional interactions between the erythropoietin receptor and a truncated form of the stk/ron receptor tyrosin kinase (abstract)." *Blood* 94(suppl1): 652a.

- Hertzano, R., *et al.* (2004); "Transcription profiling of inner ears from Pou4f3(ddl/ddl) identifies Gfi1 as a target of the Pou4f3 deafness gene." Hum Mol Genet 13(18): 2143-53.
- Heusel, J. W., *et al.* (1994); "Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells." Cell 76(6): 977-87.
- Hoatlin, M. E. und D. Kabat (1995); "Host-range control of a retroviral disease: Friend erythroleukemia." Trends Microbiol 3(2): 51-7.
- Hoatlin, M. E., *et al.* (1990); "Activation of erythropoietin receptors by Friend viral gp55 and by erythropoietin and down-modulation by the murine Fv-2r resistance gene." Proc Natl Acad Sci U S A 87(24): 9985-9.
- Hock, H., *et al.* (2003); "Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation." Immunity 18(1): 109-20.
- Hofmeister, R., *et al.* (1999); "Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action." Cytokine Growth Factor Rev 10(1): 41-60.
- Hogan, R. J., *et al.* (2001); "Activated antigen-specific CD8+ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections." J Immunol 166(3): 1813-22.
- Hu, H., *et al.* (2001); "CD4(+) T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division." Nat Immunol 2(8): 705-10.
- Huber, S. A., *et al.* (2000); "V gamma 1+ T cells suppress and V gamma 4+ T cells promote susceptibility to coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice." J Immunol 165(8): 4174-81.
- Huber, S. A., *et al.* (2002); "Vgamma4(+) T cells promote autoimmune CD8(+) cytolytic T-lymphocyte activation in coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice: role for CD4(+) Th1 cells." J Virol 76(21): 10785-90.
- Iezzi, G., *et al.* (2001); "Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo." J Exp Med 193(8): 987-93.
- Itoh, N. und S. Nagata (1993); "A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen." J Biol Chem 268(15): 10932-7.
- Jameson, S. C. (2002); "Maintaining the norm: T-cell homeostasis." Nat Rev Immunol 2(8): 547-56.
- Janeway, C. A., Jr., *et al.* (1988); "Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors." Immunol Today 9(3): 73-6.
- Janssen, O., *et al.* (2000); "Differential regulation of activation-induced cell death in individual human T cell clones." Int Arch Allergy Immunol 121(3): 183-93.
- Janssen, O., *et al.* (1991); "T cell receptor/CD3-signaling induces death by apoptosis in human T cell receptor gamma delta + T cells." J Immunol 146(1): 35-9.
- Janssen, O., *et al.* (1992); "Immunosuppression by OKT3--induction of programmed cell death (apoptosis) as a possible mechanism of action." Transplantation 53(1): 233-4.
- Jenkins, M. K. (1994); "The ups and downs of T cell costimulation." Immunity 1(6): 443-6.
- Kabelitz, D. und O. Janssen (1997); "Antigen-induced death of T-lymphocytes." Front Biosci 2: d61-77.
- Kaech, S. M. und R. Ahmed (2001); "Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells." Nat Immunol 2(5): 415-22.
- Kaech, S. M., *et al.* (2003); "Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells." Nat Immunol 4(12): 1191-8.
- Kamogawa, Y., *et al.* (1993); "The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells." Cell 75(5): 985-95.
- Karsunky, H., *et al.* (2002a); "High levels of the onco-protein Gfi-1 accelerate T-cell proliferation and inhibit activation induced T-cell death in Jurkat T-cells." Oncogene 21(10): 1571-9.
- Karsunky, H., *et al.* (2002b); "Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1." Nat Genet 30(3): 295-300.
- Katz, M. E. und F. McCormick (1997); "Signal transduction from multiple Ras effectors." Curr Opin Genet Dev 7(1): 75-9.
- Katzav, S., *et al.* (1994); "The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-Vav." J Biol Chem 269(51): 32579-85.
- Kazanjian, A., *et al.* (2004); "Growth factor independence-1 is expressed in primary human neuroendocrine lung carcinomas and mediates the differentiation of murine pulmonary neuroendocrine cells." Cancer Res 64(19): 6874-82.
- Kearney, E. R., *et al.* (1994); "Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo." Immunity 1(4): 327-39.
- Kedl, R. M. und M. F. Mescher (1998); "Qualitative differences between naive and memory T cells make a major contribution to the more rapid and efficient memory CD8+ T cell response." J Immunol 161(2): 674-83.
- Kennedy, M. K., *et al.* (2000); "Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice." J Exp Med 191(5): 771-80.
- Kerr, J. F., *et al.* (1972); "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer 26(4): 239-57.

- Kisielow, P. und H. von Boehmer** (1995); "Development and selection of T cells: facts and puzzles." Adv Immunol 58: 87-209.
- Klarnet, J. P., et al.** (1989); "FBL-reactive CD8+ cytotoxic and CD4+ helper T lymphocytes recognize distinct Friend murine leukemia virus-encoded antigens." J Exp Med 169(2): 457-67.
- Klas, C., et al.** (1993); "Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells." Int Immunol 5(6): 625-30.
- Kneitz, B., et al.** (1995); "Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice." Eur J Immunol 25(9): 2572-7.
- Kondo, T., et al.** (1995); "A single retroviral gag precursor signal peptide recognized by FBL-3 tumor-specific cytotoxic T lymphocytes." J Virol 69(11): 6735-41.
- Krammer, P. H.** (1999); "CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die." Adv Immunol 71: 163-210.
- Kroemer, G.** (1997); "The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis." Nat Med 3(6): 614-20.
- Krummel, M. F. und J. P. Allison** (1996); "CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells." J Exp Med 183(6): 2533-40.
- Ku, C. C., et al.** (2000); "Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines." Science 288(5466): 675-8.
- Ladel, C. H., et al.** (1996); "Control of natural killer cell-mediated innate resistance against the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* by gamma/delta T lymphocytes." Infect Immun 64(5): 1744-9.
- Lane, P.** (2000); "Role of OX40 signals in coordinating CD4 T cell selection, migration, and cytokine differentiation in T helper (Th)1 and Th2 cells." J Exp Med 191(2): 201-6.
- Langenkamp, A., et al.** (2000); "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells." Nat Immunol 1(4): 311-6.
- Lantz, O., et al.** (2000); "Gamma chain required for naive CD4+ T cell survival but not for antigen proliferation." Nat Immunol 1(1): 54-8.
- Lauvau, G., et al.** (2001); "Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vaccine." Science 294(5547): 1735-9.
- Le Bon, A. und D. F. Tough** (2002); "Links between innate and adaptive immunity via type I interferon." Curr Opin Immunol 14(4): 432-6.
- Leach, D. R., et al.** (1996); "Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade." Science 271(5256): 1734-6.
- Lee, K. M., et al.** (1998); "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4." Science 282(5397): 2263-6.
- Lenardo, M. J.** (1991); "Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis." Nature 353(6347): 858-61.
- Lewis, S. M.** (1994); "The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses." Adv Immunol 56: 27-150.
- Li, J. P., et al.** (1990); "Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor." Nature 343(6260): 762-4.
- Liao, X., et al.** (1997); "Proviral integrations at the Evi5 locus disrupt a novel 90 kDa protein with homology to the Tre2 oncogene and cell-cycle regulatory proteins." Oncogene 14(9): 1023-9.
- Lilly, F.** (1968); "The effect of histocompatibility-2 type on response to friend leukemia virus in mice." J Exp Med 127(3): 465-73.
- Lilly, F.** (1970); "Fv-2: identification and location of a second gene governing the spleen focus response to Friend leukemia virus in mice." J Natl Cancer Inst 45(1): 163-9.
- Lin, T., et al.** (1999); "Autospecific gammadelta thymocytes that escape negative selection find sanctuary in the intestine." J Clin Invest 104(9): 1297-305.
- Liu, X., et al.** (1996); "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." Cell 86(1): 147-57.
- Liu, Y. J., et al.** (2001); "Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation." Nat Immunol 2(7): 585-9.
- Lodolce, J. P., et al.** (1998); "IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation." Immunity 9(5): 669-76.
- Lohning, M., et al.** (1999); "T1/ST2 expression is enhanced on CD4+ T cells from schistosome egg-induced granulomas: analysis of Th cell cytokine coexpression ex vivo." J Immunol 162(7): 3882-9.
- Lu, B., et al.** (2004); "Gadd45beta is important for perpetuating cognate and inflammatory signals in T cells." Nat Immunol 5(1): 38-44.
- Lumsden, J. M., et al.** (2000); "Differential requirement for CD80 and CD80/CD86-dependent costimulation in the lung immune response to an influenza virus infection." J Immunol 164(1): 79-85.
- Luo, X., et al.** (1998); "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." Cell 94(4): 481-90.
- Mager, D., et al.** (1980); "Friend leukaemia virus-transformed cells, unlike normal stem cells, form spleen colonies in SJL/sld mice." Nature 288(5791): 592-4.
- Mager, D. L., et al.** (1981); "Quantitative colony method for tumorigenic cells transformed by two distinct strains of Friend leukemia virus." Proc Natl Acad Sci U S A 78(3): 1703-7.

- Magram, J., et al.** (1996); "IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses." Immunity 4(5): 471-81.
- Manickan, E. und B. T. Rouse** (1995); "Roles of different T-cell subsets in control of herpes simplex virus infection determined by using T-cell-deficient mouse-models." J Virol 69(12): 8178-9.
- Manjunath, N., et al.** (2001); "Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes." J Clin Invest 108(6): 871-8.
- Marengere, L. E., et al.** (1996); "Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4." Science 272(5265): 1170-3.
- Mariani, S. M., et al.** (1996); "CD95 (APO-1/Fas) and its ligand in the mouse immune system." Behring Inst Mitt(97): 12-23.
- Marks-Konczalik, J., et al.** (2000); "IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A 97(21): 11445-50.
- Marrack, P., et al.** (2000); "Homeostasis of alpha beta TCR+ T cells." Nat Immunol 1(2): 107-11.
- Martin, S. J., et al.** (1995); "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl." J Exp Med 182(5): 1545-56.
- Masopust, D., et al.** (2004); "The role of programming in memory T-cell development." Curr Opin Immunol 16(2): 217-25.
- McAdam, A. J., et al.** (2000); "Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells." J Immunol 165(9): 5035-40.
- McAdam, A. J., et al.** (1998); "The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells." Immunol Rev 165: 231-47.
- McGhee, L., et al.** (2003); "Gfi-1 attaches to the nuclear matrix, associates with ETO (MTG8) and histone deacetylase proteins, and represses transcription using a TSA-sensitive mechanism." J Cell Biochem 89(5): 1005-18.
- Medzhitov, R. und C. A. Janeway, Jr.** (1997); "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." Curr Opin Immunol 9(1): 4-9.
- Meyers, S., et al.** (1995); "The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation." Mol Cell Biol 15(4): 1974-82.
- Milligan, G. N. und D. I. Bernstein** (1995); "Analysis of herpes simplex virus-specific T cells in the murine female genital tract following genital infection with herpes simplex virus type 2." Virology 212(2): 481-9.
- Milligan, G. N. und D. I. Bernstein** (1997); "Interferon-gamma enhances resolution of herpes simplex virus type 2 infection of the murine genital tract." Virology 229(1): 259-68.
- Mittrucker, H. W., et al.** (2001); "Role of CD28 for the generation and expansion of antigen-specific CD8(+) T lymphocytes during infection with *Listeria monocytogenes*." J Immunol 167(10): 5620-7.
- Miyazawa, M., et al.** (1988); "Genetic control of T cell responsiveness to the Friend murine leukemia virus envelope antigen. Identification of class II loci of the H-2 as immune response genes." J Exp Med 168(5): 1587-605.
- Miyazawa, M., et al.** (1992); "Spontaneous recovery from Friend retrovirus-induced leukemia. Mapping of the Rfv-2 gene in the Q/TL region of mouse MHC." J Immunol 148(6): 1964-7.
- Miyoshi, H., et al.** (1993); "The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript." Embo J 12(7): 2715-21.
- Miyoshi, H., et al.** (1991); "t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1." Proc Natl Acad Sci U S A 88(23): 10431-4.
- Mombaerts, P., et al.** (1992); "Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages." Nature 360(6401): 225-31.
- Moreau-Gachelin, F., et al.** (1988); "Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias." Nature 331(6153): 277-80.
- Mosmann, T. R., et al.** (1986); "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol 136(7): 2348-57.
- Mosmann, T. R. und R. L. Coffman** (1989); "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol 7: 145-73.
- Mowat, M., et al.** (1985); "Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus." Nature 314(6012): 633-6.
- Munroe, D. G., et al.** (1990); "Inactivation of the cellular p53 gene is a common feature of Friend virus-induced erythroleukemia: relationship of inactivation to dominant transforming alleles." Mol Cell Biol 10(7): 3307-13.
- Nagy, A., et al.** (1990); "Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse." Development 110(3): 815-21.
- Nicholson, D. W.** (1999); "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death." Cell Death Differ 6(11): 1028-42.

- Nishimura, H., et al.** (2000); "Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo." J Exp Med 191(1): 157-70.
- Nossal, G. J.** (1994); "Negative selection of lymphocytes." Cell 76(2): 229-39.
- Okuda, T., et al.** (1996); "AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis." Cell 84(2): 321-30.
- Opferman, J. T., et al.** (1999); "Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes." Science 283(5408): 1745-8.
- Orkin, S. H.** (1995); "Hematopoiesis: how does it happen?" Curr Opin Cell Biol 7(6): 870-7.
- Owen, M. J. und A. R. Venkitaraman** (1996); "Signalling in lymphocyte development." Curr Opin Immunol 8(2): 191-8.
- Park, J. H., et al.** (2004); "Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival." Immunity 21(2): 289-302.
- Paul, R., et al.** (1989); "A common site for immortalizing proviral integrations in Friend erythroleukemia: molecular cloning and characterization." J Virol 63(11): 4958-61.
- Paul, W. E. und R. A. Seder** (1994); "Lymphocyte responses and cytokines." Cell 76(2): 241-51.
- Pearse, M., et al.** (1989); "A murine early thymocyte developmental sequence is marked by transient expression of the interleukin 2 receptor." Proc Natl Acad Sci U S A 86(5): 1614-8.
- Penit, C., et al.** (1995); "Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice." J Immunol 154(10): 5103-13.
- Pereira, R. A., et al.** (2000); "Granzyme A, a noncytolytic component of CD8(+) cell granules, restricts the spread of herpes simplex virus in the peripheral nervous systems of experimentally infected mice." J Virol 74(2): 1029-32.
- Perry, L. L., et al.** (1994); "Contrasting effects from a single major histocompatibility complex class II molecule (H-2E) in recovery from Friend virus leukemia." J Virol 68(8): 4921-6.
- Person, R. E., et al.** (2003); "Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2." Nat Genet 34(3): 308-12.
- Persons, D. A., et al.** (1999); "Fv2 encodes a truncated form of the Stk receptor tyrosine kinase." Nat Genet 23(2): 159-65.
- Petrie, H. T., et al.** (1995); "T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production." J Exp Med 182(1): 121-7.
- Piccotti, J. R., et al.** (1998); "Alloantigen-reactive Th1 development in IL-12-deficient mice." J Immunol 160(3): 1132-8.
- Pihlgren, M., et al.** (1996); "Resting memory CD8+ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro." J Exp Med 184(6): 2141-51.
- Puthalakath, H., et al.** (1999); "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex." Mol Cell 3(3): 287-96.
- Qian, D. und A. Weiss** (1997); "T cell antigen receptor signal transduction." Curr Opin Cell Biol 9(2): 205-12.
- Riedl, S. J., et al.** (2005); "Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP." Nature 434(7035): 926-33.
- Roberts, T., et al.** (1998a); "Molecular characterization of the 1p22 breakpoint region spanning the constitutional translocation breakpoint in a neuroblastoma patient with a t(1;10)(p22;q21)." Cancer Genet Cytogenet 100(1): 10-20.
- Roberts, T., et al.** (1998b); "NB4S, a member of the TBC1 domain family of genes, is truncated as a result of a constitutional t(1;10)(p22;q21) chromosome translocation in a patient with stage 4S neuroblastoma." Hum Mol Genet 7(7): 1169-78.
- Robertson, M. N., et al.** (1992); "Role and specificity of T-cell subsets in spontaneous recovery from Friend virus-induced leukemia in mice." J Virol 66(6): 3271-7.
- Rocha, B., et al.** (1992); "Selection of intraepithelial lymphocytes with CD8 alpha/alpha co-receptors by self-antigen in the murine gut." Proc Natl Acad Sci U S A 89(12): 5336-40.
- Rödel, B., et al.** (2000); "The zinc finger protein Gfi-1 can enhance STAT3 signaling by interacting with the STAT3 inhibitor PIAS3." Embo J 19(21): 5845-55.
- Rudd, C. E.** (1996); "Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function." Immunity 4(6): 527-34.
- Russell, J. H., et al.** (1991); "Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells." Proc Natl Acad Sci U S A 88(6): 2151-5.
- Saint-Ruf, C., et al.** (1994); "Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene." Science 266(5188): 1208-12.
- Sallusto, F., et al.** (1999); "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature 401(6754): 708-12.
- Sallusto, F., et al.** (1998); "Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes." J Exp Med 187(6): 875-83.

- Salomon, B. und J. A. Bluestone (2001); "Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation." Annu Rev Immunol 19: 225-52.
- Salvesen, G. S. (1999); "Caspase 8: igniting the death machine." Structure Fold Des 7(10): R225-9.
- Sasaki, T., *et al.* (2000); "Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration." Science 287(5455): 1040-6.
- Scaffidi, C., *et al.* (1998); "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." Embo J 17(6): 1675-87.
- Scheijen, B., *et al.* (1997); "Characterization of pal-1, a common proviral insertion site in murine leukemia virus-induced lymphomas of c-myc and Pim-1 transgenic mice." J Virol 71(1): 9-16.
- Scheipers, P. und H. Reiser (1998); "Role of the CTLA-4 receptor in T cell activation and immunity. Physiologic function of the CTLA-4 receptor." Immunol Res 18(2): 103-15.
- Schluns, K. S., *et al.* (2000); "Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo." Nat Immunol 1(5): 426-32.
- Schmidt, T., *et al.* (1998a); "Zinc finger protein GFI-1 has low oncogenic potential but cooperates strongly with pim and myc genes in T-cell lymphomagenesis." Oncogene 17(20): 2661-7.
- Schmidt, T., *et al.* (1998b); "Evidence implicating Gfi-1 and Pim-1 in pre-T-cell differentiation steps associated with beta-selection." Embo J 17(18): 5349-59.
- Schmidt, T., *et al.* (1996); "MoMuLV proviral integrations identified by Sup-F selection in tumors from infected myc/pim bitransgenic mice correlate with activation of the gfi-1 gene." Nucleic Acids Res 24(13): 2528-34.
- Schmitz, I., *et al.* (2000); "Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways." Int J Biochem Cell Biol 32(11-12): 1123-36.
- Schneider, H., *et al.* (1995); "T cell antigen CD28 binds to the GRB-2/SOS complex, regulators of p21ras." Eur J Immunol 25(4): 1044-50.
- Schneider, H., *et al.* (1995); "CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells." J Exp Med 181(1): 351-5.
- Schneider, P., *et al.* (1998); "Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity." J Exp Med 187(8): 1205-13.
- Schulze-Osthoff, K., *et al.* (1998); "Apoptosis signaling by death receptors." Eur J Biochem 254(3): 439-59.
- Sebzda, E., *et al.* (1999); "Selection of the T cell repertoire." Annu Rev Immunol 17: 829-74.
- Seddon, B., *et al.* (2003); "Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells." Nat Immunol 4(7): 680-6.
- Serfling, E., *et al.* (1995); "The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation." Biochim Biophys Acta 1263(3): 181-200.
- Shresta, S., *et al.* (1998); "How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?" Curr Opin Immunol 10(5): 581-7.
- Singer, G. G. und A. K. Abbas (1994); "The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice." Immunity 1(5): 365-71.
- Smit, L., *et al.* (1994); "B cell antigen receptor stimulation induces formation of a Shc-Grb2 complex containing multiple tyrosine-phosphorylated proteins." J Biol Chem 269(32): 20209-12.
- Sperling, A. I. und J. A. Bluestone (2001); "ICOS costimulation: It's not just for TH2 cells anymore." Nat Immunol 2(7): 573-4.
- Sprent, J., *et al.* (2000); "T-cell proliferation in vivo and the role of cytokines." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 355(1395): 317-22.
- Steele, C. R., *et al.* (2000); "Gamma(delta) T cells: non-classical ligands for non-classical cells." Curr Biol 10(7): R282-5.
- Stingl, G., *et al.* (1987); "Thy-1+ dendritic epidermal cells express T3 antigen and the T-cell receptor gamma chain." Proc Natl Acad Sci U S A 84(13): 4586-90.
- Stout, R. D. und J. Suttles (1992); "T cells bearing the CD44hi "memory" phenotype display characteristics of activated cells in G1 stage of cell cycle." Cell Immunol 141(2): 433-43.
- Strasser, A., *et al.* (1991); "bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship." Cell 67(5): 889-99.
- Strasser, A., *et al.* (1995); "Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis." Embo J 14(24): 6136-47.
- Suda, T., *et al.* (1997); "Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing." J Exp Med 186(12): 2045-50.
- Suda, T., *et al.* (1996); "Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand." J Immunol 157(9): 3918-24.
- Susin, S. A., *et al.* (1996); "Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease." J Exp Med 184(4): 1331-41.
- Szabo, S. J., *et al.* (1997); "Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells." J Exp Med 185(5): 817-24.
- Tan, J. T., *et al.* (2001); "IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells." Proc Natl Acad Sci U S A 98(15): 8732-7.

- Tarakhovsky, A., et al.** (1995); "Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav." Nature 374(6521): 467-70.
- Thompson, C. B. und J. P. Allison** (1997); "The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator." Immunity 7(4): 445-50.
- Tilloy, F., et al.** (1999); "An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals." J Exp Med 189(12): 1907-21.
- Topham, D. J., et al.** (1997); "CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes." J Immunol 159(11): 5197-200.
- Tough, D. F., et al.** (1996); "Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo." Science 272(5270): 1947-50.
- Tough, D. F., et al.** (1997); "T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS)." J Exp Med 185(12): 2089-94.
- Trauth, B. C., et al.** (1989); "Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis." Science 245(4915): 301-5.
- Tsujimura, K., et al.** (2001); "The binding of thymus leukemia (TL) antigen tetramers to normal intestinal intraepithelial lymphocytes and thymocytes." J Immunol 167(2): 759-64.
- Tuosto, L., et al.** (1996); "p95vav associates with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in antigen-stimulated T cells." J Exp Med 184(3): 1161-6.
- Turner, M., et al.** (1997); "A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes." Immunity 7(4): 451-60.
- van Lohuizen, M. und A. Berns** (1990); "Tumorigenesis by slow-transforming retroviruses--an update." Biochim Biophys Acta 1032(2-3): 213-35.
- van Lohuizen, M., et al.** (1991); "Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging." Cell 65(5): 737-52.
- Van Parijs, L., et al.** (1997); "Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor." J Immunol 158(8): 3738-45.
- van Stipdonk, M. J., et al.** (2001); "Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation." Nat Immunol 2(5): 423-9.
- Vander Heiden, M. G. und C. B. Thompson** (1999); "Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?" Nat Cell Biol 1(8): E209-16.
- Veiga-Fernandes, H., et al.** (2000); "Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo." Nat Immunol 1(1): 47-53.
- Vivien, L., et al.** (2001); "T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo." Int Immunol 13(6): 763-8.
- von Boehmer, H.** (1992); "Thymic selection: a matter of life and death." Immunol Today 13(11): 454-8.
- von Boehmer, H.** (1994); "Positive selection of lymphocytes." Cell 76(2): 219-28.
- von Boehmer, H. und H. J. Fehling** (1997); "Structure and function of the pre-T cell receptor." Annu Rev Immunol 15: 433-52.
- Wallis, D., et al.** (2003); "The zinc finger transcription factor Gfi1, implicated in lymphomagenesis, is required for inner ear hair cell differentiation and survival." Development 130(1): 221-32.
- Walunas, T. L., et al.** (1996); "CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation." J Exp Med 183(6): 2541-50.
- Wendling, F., et al.** (1981); "Emergence of tumorigenic cells during the course of Friend virus leukemias." Proc Natl Acad Sci U S A 78(6): 3614-8.
- Whitley, R. J. und B. Roizman** (2001); "Herpes simplex virus infections." Lancet 357(9267): 1513-8.
- Willerford, D. M., et al.** (1996); "Developmental regulation of V(D)J recombination and lymphocyte differentiation." Curr Opin Genet Dev 6(5): 603-9.
- Williams, G. T., et al.** (1990); "Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis." Nature 343(6253): 76-9.
- Wong, P. und E. G. Pamer** (2001); "Cutting edge: antigen-independent CD8 T cell proliferation." J Immunol 166(10): 5864-8.
- Wu, J., et al.** (1996); "Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation." Immunity 4(6): 593-602.
- Wurster, A. L., et al.** (2000); "The biology of Stat4 and Stat6." Oncogene 19(21): 2577-84.
- Wyllie, A. H., et al.** (1980); "Cell death: the significance of apoptosis." Int Rev Cytol 68: 251-306.
- Wyllie, A. H., et al.** (1984); "Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis." J Pathol 142(1): 67-77.
- Xu, D., et al.** (1998); "Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells." J Exp Med 187(5): 787-94.

- Yawalkar, N., et al.** (2000); "Human afferent lymph from normal skin contains an increased number of mainly memory / effector CD4(+) T cells expressing activation, adhesion and co-stimulatory molecules." Eur J Immunol 30(2): 491-7.
- Yu, X. Z. und C. Anasetti** (2000); "Enhancement of susceptibility to Fas-mediated apoptosis of TH1 cells by nonmitogenic anti-CD3epsilon F(ab')2." Transplantation 69(1): 104-12.
- Yu, X. Z., et al.** (1996); "Induction of apoptosis by anti-CD3 epsilon F(ab')2 in antigen receptor transgenic murine T cells activated by specific peptide." J Immunol 157(8): 3420-9.
- Yücel, R., et al.** (2003); "The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit+ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus." J Exp Med 197(7): 831-44.
- Yücel, R., et al.** (2004); "Gfi1:green fluorescent protein knock-in mutant reveals differential expression and autoregulation of the growth factor independence 1 (Gfi1) gene during lymphocyte development." J Biol Chem 279(39): 40906-17.
- Zeng, H., et al.** (2004); "Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells." Embo J 23(20): 4116-25.
- Zha, J., et al.** (1996); "Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)." Cell 87(4): 619-28.
- Zhang, R., et al.** (1995); "Defective signalling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the vav proto-oncogene." Nature 374(6521): 470-3.
- Zhang, X., et al.** (1998); "Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15." Immunity 8(5): 591-9.
- Zhang, Y. und J. P. Allison** (1997); "Interaction of CTLA-4 with AP50, a clathrin-coated pit adaptor protein." Proc Natl Acad Sci U S A 94(17): 9273-8.
- Zhang, Y., et al.** (2001); "Interferon gamma stabilizes the T helper cell type 1 phenotype." J Exp Med 194(2): 165-72.
- Zhong, W., et al.** (2000); "CD4+ T cell priming accelerates the clearance of Sendai virus in mice, but has a negative effect on CD8+ T cell memory." J Immunol 164(6): 3274-82.
- Zhu, J., et al.** (2002); "Growth factor independent-1 induced by IL-4 regulates Th2 cell proliferation." Immunity 16(5): 733-44.
- Zhu, J. W., et al.** (2001); "E2F1 and E2F2 determine thresholds for antigen-induced T-cell proliferation and suppress tumorigenesis." Mol Cell Biol 21(24): 8547-64.
- Zimmerman, C., et al.** (1996); "Visualization, characterization, and turnover of CD8+ memory T cells in virus-infected hosts." J Exp Med 183(4): 1367-75.
- Zörnig, M., et al.** (1996); "Zinc finger protein GFI-1 cooperates with myc and pim-1 in T-cell lymphomagenesis by reducing the requirements for IL-2." Oncogene 12(8): 1789-801.
- Zou, H., et al.** (1997); "Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." Cell 90(3): 405-13.
- Zou, H., et al.** (1999); "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." J Biol Chem 274(17): 11549-56.
- Zuniga-Pflücker, J. C. und M. J. Lenardo** (1996); "Regulation of thymocyte development from immature progenitors." Curr Opin Immunol 8(2): 215-24.
- Zweidler-Mckay, P. A., et al.** (1996); "Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor." Mol Cell Biol 16(8): 4024-34.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CD	internationale Nomenklatur für Oberflächenmarker (cluster of differentiation)
cDNA	Kopie-DNA (copy-DNA)
CT	Cycle Treshold
DEPC	Diethylpyrocarbonat
CFSE	Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester
DMEM	"Dulbecco's modified eagles medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negativ
DP	doppelt positiv
DNA	Desoxyribonukleinsäure ("acid")
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ("acid")
Fa	Firma
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FBS	foetales Rinderserum (fetal bovine serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FV	Friend Virus
GO	Gene Ontologie
h	Stunde (hour)
hi	hoch (high)
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
int	mittlere (intermediate)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KI	Knock In
KO	Knock Out
L	Ligand
lo	niedrig (low)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	Haupthistokompatibilitäts Komplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (engl. „messenger RNA“)
NC	Nitrocellulose
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
PI	Propidiumiodid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure („acid“)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SP	einzel positiv (single positiv)
SCF	stem cell factor (c-Kit Ligand)
SPF	spezifisch pathogenfrei
SSC	Citrat-gepufferte Kochsalzlösung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zell Rezeptor (T-cell receptor)
TE	Tris-EDTA-Puffer

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetramer
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen (weight/volume)

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Der TCR-Komplex.....	6
Abbildung 1.2: Die Bildung von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Effektorzellen	8
Abbildung 1.3: Die drei Phasen der Immunantwort	12
Abbildung 1.4: Die Bildung von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Effektorzellen.....	14
Abbildung 1.5: Der pal-1Lokus	22
Abbildung 2.1: Strategie zur Inaktivierung des Evi5 Gens.....	28
Abbildung 2.2: Nachweis der homologen Rekombination auf DNA und RNA Ebene	29
Abbildung 2.3: B- und T-Zellen in wt und Evi5 ^{-/-} Mäusen	30
Abbildung 2.4: FACS-Analyse hämatopoetischer wt und Evi5 ^{-/-} Zellen aus dem Knochenmark	31
Abbildung 2.5: FACS-Analyse der CD3 ⁺ , CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphocyten.....	32
Abbildung 2.6: Gesamtzellzahlen verschiedener Lymphocyten Populationen in der Milz.....	33
Abbildung 2.7: Prozentuale Anteile der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen in der Milz	33
Abbildung 2.8: $\gamma\delta$ T-Zellen in der Milz und im Thymus.....	34
Abbildung 2.9: Gedächtnis T-Zellen in der Milz und in den zervikalen Lymphknoten	35
Abbildung 2.10: Prozentuale Anteile der Effektor und zentralen Gedächtnis T-Zellpopulationen.....	36
Abbildung 2.11: Gesamtzellzahlen der Gedächtnis T-Zellen	36
Abbildung 2.12: Expression von CD45Rb und CD122 auf Gedächtnis T-Zellen	37
Abbildung 2.13: AnnexinV Färbung von Gedächtnis T-Zellen.....	38
Abbildung 2.14: CD122 und CD45Rb Expression in Gfi1 ^{-/-} “vav-Gfi1“ doppelt transgenen Mäusen	39
Abbildung 2.15: IL-7R α Expression auf naiven.....	40
Abbildung 2.16: IL-7R α Expression in verschiedenen Gedächtnis T-Zell-Populationen.....	40
Abbildung 2.17: FSC/SSC Darstellung von wt und Gfi1-defizienten Lymphocyten nach TCR-Stimulation	41
Abbildung 2.18: Propidium Iodid (PI) Färbung von Thy1.2 ⁺ Lymphocyten.....	42
Abbildung 2.19: PI Färbung von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Lymphocyten	43
Abbildung 2.20: CFSE Färbung von Thy1.2 ⁺ Milzzellen	44
Abbildung 2.21: CFSE Färbung von sortierten Thy1.2 ⁺ T-Zellen.....	45
Abbildung 2.22: Schematische Darstellung des <i>in vivo</i> Proliferationsexperimentes	46
Abbildung 2.23: <i>In vivo</i> Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen	47

Abbildung 2.24: <i>In vivo</i> Proliferation von CD8 ⁺ T-Zellen	47
Abbildung 2.25: <i>In vivo</i> Peptid-Stimulation von OT-II transgenen Mäusen	48
Abbildung 2.26: AnnexinV Färbung von stimulierten Milzzellen	49
Abbildung 2.27: CD3 induzierte Apoptose in T-Lymphocyten.....	50
Abbildung 2.28: CD95 induzierte Apoptose in T-Lymphocyten.....	50
Abbildung 2.29: Verzeichnisbaum der unterschiedlich regulierten Gene in den Gfi1 ^{-/-} T-Zellen gegenüber wt T-Zellen und deren Zuordnung in bestimmte biologische Prozesse (ausgewertet mit „Spotfire“)	52
Abbildung 2.30: Positive Regulation der Apoptose.....	53
Abbildung 2.31: „Heatmap“ der zwischen Gfi1 ^{-/-} und wt T-Zellen unterschiedlich regulierten Gene	54
Abbildung 2.32: Expressionsunterschiede einzelner Gene der Lymphocytenaktivierung und der Apoptose in Gfi1 ^{-/-} und wt T-Zellen.....	55
Abbildung 2.33: Expressionsverläufe der ausgewählten Gene.....	56
Abbildung 2.34: RT-PCR der ausgewählten Gene	57
Abbildung 2.35: Real-Time PCR.....	58
Abbildung 2.36: Milzgewichte von infizierten und nicht infizierten C57Bl/6 Mäusen.....	60
Abbildung 2.37: Bestimmung der Milzzellzahlen in FV infizierten Gfi1 ^{-/-} und wt Mäusen ...	61
Abbildung 2.38: Bestimmung der AK34 Menge im Blut FV infizierter Gfi1 ^{-/-} und wt C57Bl/6 Mäuse	61
Abbildung 2.39: Tetramer Färbung FV spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	62
Abbildung 2.40: CTL Aktivität der FV spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen.....	62
Tabelle 2.41: B-Zellantwort gegenüber der FV Infektion.....	63
Abbildung 2.42: B- und T-Zellen in FV infizierten Mäusen	63
Abbildung 2.43: Prozentualer Anteil der T-Zellen in Milzen und zervikalen Lymphknoten von FV infizierten Mäusen.....	64
Abbildung 2.44: Gesamtzellzahlen der T-Lymphocyten nach FV Infektion.....	65
Abbildung 2.45: Analyse der T-Zellen nach zehntägiger FV Infektion	65
Abbildung 2.46: Gedächtnis T-Zellen in FV infizierten Mäusen	66
Abbildung 2.47: Prozentuale Anteile der Gedächtnis T-Zellen in FV infizierten Mäusen.....	67
Abbildung 2.48: Aktivierte CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen in FV infizierten Mäusen.....	67
Abbildung 2.49: Prozentuale Anteile der aktivierten T-Zellen in FV infizierten Mäusen	68
Abbildung 2.50: Zytokinproduktion der FV infizierten T-Zellen.....	68
Abbildung 2.51: IFN γ , TNF α und IL-2 Produktion in FV infizierten CD8 ⁺ T-Zellen.....	69

Abbildung 2.52: IFN γ Produktion in aktivierten CD8 ⁺ T-Zellen.....	69
Abbildung 2.53: $\gamma\delta$ T-Zellen in FV infizierten Mäusen.....	70

7.3 Verwendete Primer und Real-Time PCR Assays

7.3.1 Primer

Apaf1for	5'-ACGGCGGCTGGGTAAC-3'
Apaf1rev	5'-AATTCACAGCTTTATAAAAGTTGAT-3'
Badfor	5'-GGGGACCGAGGAGGATGA-3'
Badrev	5'-GGGTAGAGTTCCGGGATGT-3'
BCL2for	5'-TTGAGTTCGGTGGGGTCATG3
BCL2rev	5'-ATATTTGTTTGGGGCAGGTTTG-3'
Cebpbfor	5'-GCGGTGCGCAAGAGCCG-3'
Cebpbrev	5'- CAGGTGCGCGCAGGGCAC-3'
E2F1for	5'- GTCAATCCCTGTTGGGCCT-3'
E2F1rev	5'-TCCAGACACCCTGAATCCC-3
Gadd45for	5'- TCCTGGGGGAGCCGGCG-3'
Gadd45rev	5'-CACGGGTAGGGTAGCCTTT-3'
Mycfor	5'- CCCTGCCAAGAGGTCGGA-3'
Mycrev	5'- TTCCAGCTCCTCCTCGAGT-3'
Notch1for	5'-GTGCACACCATCTGCCCC-3'
Notch1rev	5'-GGGTCCTGCATCCCACATCTCTG-3'
Pi3kfor	5'-TTGTGATGGGATCTTCTGGAA-3'
Pi3krev	5'-AACGCTGATGATTGACATGCT-3'
Tgfb1for	5'-GCTCCACAGAGAAGAACTGC-3'
Tgfb1rev	5'-TTGCAGGAGCGCACAAATCAT-3'
IL-15for	5'-AACAGCACTCTGTCTTCTAAC-3'
IL-15rev	5'-TTTCATGTGATCCAAGTGGCT-3'
IL-4for	5'-GTGCCAAACGTCCTCACAG-3'
IL-4rev	5'-TAAAGCATGGTGGCTCAGTAC-3'
CD28for	5'-CGCCTTACCTAGACAACGAG-3'
CD28rev	5'-CTTCTGGATAGGGGTCCT-3'
CD3for	5'-CAAGAATAGGAAGGCCAAGG-3'
CD3rev	5'-GACACGTGTTACCAGGAG-3'
P21for	5'-GTGAGCAGTTGCGCCGTGATTG-3'

P21rev 5'-GCTAAGGCCGAAGATGGGGAAGAG-3'
 GAPDHfor 5'-TGTCTTCACCACCATGGAGA-3'
 GAPDHrev 5'-CGGCCATCACGCCACAGCTT-3'
 EviKOforPrimer 5'-ATGGTTACCACCAAAATGACT-3'
 EviKOforPrimer 5'-CTCTATTAATCTGTTTTGTTCC-3'

7.3.2 Real-Time PCR Assays (Applied Biosystems)

Mm00432448_m1	Cdkn1a, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) (Mus musculus)
Mm00487803_m1	Myc, myelocytomatosis oncogene (Mus musculus)
Mm00445259_m1	Il4, interleukin 4 (Mus musculus)
Mm00437530_m1	Apaf1, apoptotic protease activating factor 1 (Mus musculus)
Mm00432042_m1	Bad, Bcl-associated death promoter (Mus musculus)
Mm00477631_m1	Bcl2, B-cell leukemia/lymphoma 2 (Mus musculus)
Mm00441724_m1	Tgfb1, transforming growth factor, beta 1 (Mus musculus)
Mm00435123_m1	Gadd45b, growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta (Mus musculus)
Mm00843434_s1	Cebpb, CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (Mus musculus)
Mm00445038_m1	Pik3cg, phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide (Mus musculus)
Mm00434210_m1	Il15, interleukin 15 (Mus musculus)
Mm00435245_m1	Notch1, Notch gene homolog 1 (Drosophila) (Mus musculus)
Mm00483137_m1	Cd28, CD28 antigen (Mus musculus)
Mm00432939_m1	E2f1, E2F transcription factor 1 (Mus musculus)
Mm00599683_m1	Cd3e, CD3 antigen, epsilon polypeptide (Mus musculus)
Mm00438864_m1	Tnfsf6, tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6 (Mus musculus)
Mm00458268_m1	Sdhb, succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip) (Mus musculus)
Mm00433237_m1	Tnfrsf6, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6 (Mus musculus)
Mm99999915_g1	Gapd, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Mus musculus)

7.4 Lebenslauf

Name: Denise, Jasmin Pargmann

Geburtsdatum: 18.09.1976

Geburtsort: Essen

Familienstand: ledig

Hochschulausbildung

Seit Nov. 2001	Promotion am Institut für Zellbiologie, AG Prof. T. Mörry Thema: „Charakterisierung der Funktion des Transkriptionsfaktors Gfi1 während der T-Zell vermittelten Immunantwort in Gfi1-defizienten Mäusen“
Nov. 2000 - Aug. 2001	Diplomarbeit an der Fakultät für Chemie der Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl Biochemie II, AG Molekulare Zellbiochemie, Prof. B. Hovemann Thema: „ <i>In vivo</i> Charakterisierung einer Geruchsrezeptor OR43a-EGFP Fusion in transgenen <i>Drosophila</i> Stämmen“
Okt. 1996 - Aug. 2000	Studium der Biochemie an der Fakultät für Chemie der Ruhr-Universität Bochum; Abschluss: Diplom

Schulbildung

Jun. 1987 - Jun. 1996	Gymnasium Borbeck, Essen Abschluss: Abitur
Feb. 1987 - Jun. 1987	Grundschule Walter-Pleitgen, Essen
Jun. 1985 - Feb. 1987	Städt. Gemeinschafts-Grundschule, Krefeld
Jun. 1983 - Jun. 1985	Grundschule Kraienbruch, Essen

7.5 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

7.5.1 Fachartikel

Pargmann, D, Yücel, R und Möröy, T (2005)

Zinc finger protein Gfi1 controls proliferation and death of peripheral T-lymphocytes

In Vorbereitung

Pargmann D, Schimmer, S, Dittmer, U und Möröy, T (2005)

Loss of the zinc finger protein Gfi1 abrogates resistance against Friend virus infection in C57Bl/6 mice

In Vorbereitung

7.5.2 Poster

Denise Pargmann, Raif Yücel , Christian Kosan , Holger Karsunky and Tarik Möröy (2004)

A role for the zinc finger transcription factor Gfi1 in T-cell activation and in formation of T-cell memory

12th International Congress of Immunology, Montreal; Clinical and investigative Medicine (CIM) Vol.27, No.4, August 2004

Denise Pargmann, Simone Schimmer, Ulf Dittmer and Tarik Möröy (2004)

The transcriptionfactor Gfi1 plays a role in the formation of friend virus induced erythroleukemia

3. Forschungstag der Medizinischen Fakultät und der Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen

7.5.3 Vortrag

Denise Pargmann, Klemens Störckuhl und Bernd Hovemann (2001)

OR43a-olfactory receptor - eGFP fusion construct for *in vivo* expression monitoring with functional activity.

8th Regional Drosophila Meeting, Biozentrum Universität Würzburg

7.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich als erstes meiner Familie danken, die mich in allen Lebenslagen immer unterstützt hat. Besonders danke ich meinem Vater, der mir das Studium ermöglicht hat und schon früh meine Begeisterung für die Naturwissenschaften geweckt hat. Meiner Mutter danke ich für die große Hilfe, die sie mir zu Hause war, so dass ich mich allein um das Zusammenschreiben dieser Promotionsarbeit kümmern konnte und meiner Schwester Jenny danke ich für das Abtippen meiner Einleitung, wenn mir mal wieder aufgrund der „veränderten Umstände“ schlecht war.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem geduldigen Freund Arnd, der mich immer mit kompetenten Ratschlägen unterstützt hat und der wohl am meisten unter seiner schlecht gelaunten Freundin zu leiden hatte, wenn mal wieder ein Experiment nicht so geklappt hat wie es eigentlich sein sollte.

Herrn Prof. Tarik Möröy möchte ich für das interessante Thema danken, für seine konstruktiven Diskussionen und ganz besonders für sein immer offenes Ohr für eigene Ideen.

Weiterhin danke ich allen Mitgliedern der AGI:

Christian Kosan danke ich für seine positive Lebenseinstellung- „es ist schon alles nicht so schlimm“-, für die lustigen Kaffee-Pausen und ganz besonders für seine Qualitäten als Diätberater...

Raif Yücel danke ich, dass er bei mir die Begeisterung für die Flowcytometrie geweckt hat (...was aber nicht heißen soll, dass ich jetzt einer der „Hi Flowers“ werden will ☺).

Katharina Fiolka möchte ich für ihre große Hilfsbereitschaft danken und für die schönen Mittagspausen. An dieser Stelle danke ich auch Hui Zeng für seine nützlichen Tips und für die „Mittagsdiskussionen“ (...Frauen und logisches Denken sind nicht zwei völlig unzusammenhängende Dinge!).

Bei Diskussionen fällt mir natürlich sofort der Lothar Vaßen ein ☺...ihm Danke ich für seine Hilfe in allen molekularbiologischen Fragen und für seine Unterstützung gerade zu Beginn meiner Doktorarbeit, wo er mir mit vielen Ratschlägen geholfen hat.

Angelika Warda möchte ich für die tausenden von Minis und Maxis danken aber am meisten für die „seelische“ Unterstützung in allen Lebenslagen und dafür, dass ich heute die „Dinge“ aus einem ganz anderen Blickwinkel betrachten kann.

Florian Heyd und Emeka Igwe danke ich dafür, dass sie gerade zum Schluß meiner Arbeit die heiß begehrten Gfi1 Knock outs an mich abgetreten haben, auch wenn die Mauslage sehr „dünn“ war.

Cyrus Khandanpour danke ich für seine ganzen medizinischen Tips und beruhigenden Worte, wenn es mit dem Herz mal wieder schlimmer war.

Stefan Mahlmann danke ich für die Erleuchtung, dass es möglich ist zwei Jahre lang denselben Witz zu erzählen (Was ist der Unterschied zwischen einem Raben?...erstaunlicher ist jedoch, dass ich die Antwort immer noch nicht weiß ☺...).

Inge Spratte möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft, für die Southern Blots und für ihre leckeren Kuchen danken.

Ludger Klein-Hitpaß danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der Array Daten und Adriane Parchatka für die RNA Präparationen.

Ralph Waldschütz danke ich für nützliche PCR Tips und zusammen mit Wojciech Wegrzn, Petra Plessow und Thomas Civela für die ganze „Mausarbeit“.

Klaus Lennartz danke ich für die Hilfe bei allen Computerproblemen.

Den ehemaligen Mitgliedern der AGI Beate Fraß, Sarah Tessmann und Malte Bachmann danke ich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

7.7 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 und 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Charakterisierung der Funktion des Transkriptionsfaktors Gfi1 während der T-Zell vermittelten Immunantwort in Gfi1 defizienten Mäusen “ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Denise Pargmann befürworte.

Essen, den 27.06.2005

(Prof. Dr. Tarik Möröy)

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 und 9 zu Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 27.06.2005

(Denise Pargmann)

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 und 9 zu Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 27.06.2005

(Denise Pargmann)